

Санкт-Петербургский государственный университет.

Физический факультет.

Направление «Физика».

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров.

Пространственная организация прионной формы белка Sup35NMr



Бакалаврская работа студента 4 курса

Поповой Марии Андреевны

Научный руководитель:

канд. ф.-м. н. Соколов П.А.

Рецензент:

канд. б. н. Белоусов М.В.

Санкт-Петербург

2018

Введение.....	3
1. Обзор литературы.....	4
1.1. Строение белка Sup35.....	4
1.2. Модели структурной организации фибрилл.....	6
1.3. Мутации белка Sup35.....	7
1.4. Работы по исследованию белков с помощью динамического рассеяния света.....	8
2. Методы исследования фибрилл белка Sup35.....	9
2.1. Атомная силовая микроскопия (АСМ, AFM).....	9
2.2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ, SEM).....	11
2.3. Динамическое рассеяние света.....	13
2.4. Программная обработка данных динамического светорассеяния.....	14
3. Материалы и приготовление образцов.....	19
3.1. Материалы.....	19
3.2. Фильтрация раствора белка.....	19
3.3. Приготовление кювет для динамического светорассеяния.....	20
3.4. Приготовление растворов белка.....	20
3.5. Подготовка образцов для АСМ и СЭМ.....	21
4. Результаты и обсуждение.....	21
4.1. Изучение агрегации белка Sup35-M0.....	21
4.2. Изучение агрегации белка Sup35-WT.....	28
4.3. Изучение агрегации белка Sup35-M5.....	30
4.4. Изучение агрегации белка Sup35-74.....	34
4.5. Сравнение кинетики агрегаций различных образцов.....	37
Заключение.....	41
Список использованной литературы.....	42

Введение.

Прионами называют самораспространяющиеся и трансформируемые белковые изоформы. Они представляют собой белки с аномальной третичной структурой, способные индуцировать конформационное превращение гомологичных им нормальных клеточных белков в прионную форму. Белок в прионной форме меняет укладку нормального белка «по своему образу и подобию», изменяя его третичную структуру и таким образом увеличивая количество прионных белков. Такие неправильно уложенные белки, в свою очередь, образуют амилоиды — фибриллярные отложения, содержащие большое количество β -структур, размером от небольших олигомеров до больших нерастворимых агрегатов.

Накопление белковых амилоидов в организме человека или млекопитающих, а конкретно, в их нервных клетках, является причиной развития различных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, Хантингтона, Крейтцфельда-Якоба и других. На данный момент не существует ни действенных методов лечения подобных болезней, ни точного описания механизма их развития, чем и объясняется актуальность исследований механизма образования амилоидов и распространения прионов.

Белок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - Sup35 используется в качестве удобной модельной системы для изучения механизмов образования и распространения амилоидов. Механизм его прионизации достаточно хорошо изучен и описан в большом количестве различных научных работ. Хотя он и не гомологичен прионному белку млекопитающих PrP, ответственному за заболевания человека, однако механизм его укладки и агрегации весьма схож с механизмами для PrP, поэтому понимание переходных процессов для белка Sup35 может проложить путь для разработки эффективной диагностики и лечения заболеваний.

Количество полученной информации о механизмах агрегации и о структурных и морфологических свойствах агрегатов в последнее время значительно увеличилось, однако детальный механизм перехода белков в амилоидную форму, а также влияние амилоидных агрегатов на цитотоксичность на данный момент остаются неизвестными. Для исследования амилоидообразования применяют ряд различных методик, таких как микроскопия, метод кругового дихроизма, флуоресценция в присутствии тиофлавина Т, инфракрасная спектроскопия и метод динамического рассеяния света.

В данной работе изучалась кинетика агрегации и морфология полученных фибрилл белка Sup35 с помощью динамического рассеяния света, сканирующей электронной микроскопии и атомной силовой микроскопии.

1. Обзор литературы.

1.1. Структура белка Sup35.

Белок Sup35 представляет собой 685-остаточный белок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В своей нормальной растворимой форме Sup35p связывается с Sup45, образуя гетеродимер, который отвечает за терминацию трансляции [1].

Прион $[PSI^+]$ представляет собой самораспространяющийся амилоид белка Sup35, причем при переходе этого белка в амилоидную форму происходит значительная утрата его функций, то есть $[PSI^+]$ действует как глобальный супрессор [1]. Наследуемое сообщение $[PSI^+]$ переносится измененной структурой белка, подобно тому, как распространяются прионы млекопитающих.

Белок Sup35 состоит из трех доменов: С-концевой домен с функцией терминации трансляции, высоко заряженный средний домен (М) и N-концевой домен, необходимый и достаточный для распространения $[PSI^+]$ [2].

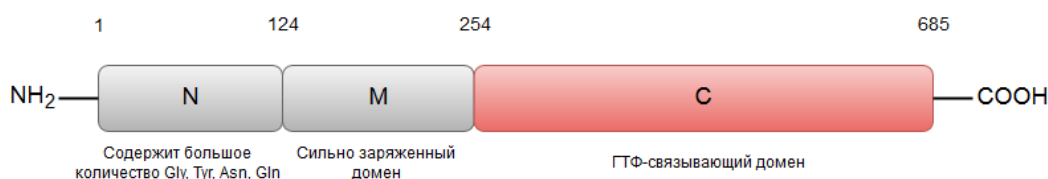


Рис.1. Схема доменной структуры белка Sup35

Домен С (остатки 254-685) – карбокси-терминальный домен, отвечающий за терминацию трансляции, содержит в своем составе четыре сайта связывания с ГТФ и именно он обеспечивает связывание с Sup45 [2].

Функции доменов N и M ясны не полностью, существуют лишь некоторые предположения об их возможной роли в клеточных процессах. Например, N и M домены необходимы для связывания белка, участвующего в контроле стабильности мРНК, N-домен также связывается с белком, принимающим участие в формировании цитоскелета. На основании этого были сделаны предположения о таких функциях Sup35, как участие в формировании структур цитоскелета, а также в системах, связанных с деградацией мРНК [2].

Прионный домен (PrD) белка Sup35 (Sup35N, остатки 1-124) богат аспарагином и глутамином, является слабо заряженным. Он имеет пять несовершенных повторов с девятью аминокислотными остатками последовательностью PQGGYQQYN, схожей с последовательностью прионных белков человека (PHGGGWGQ) [3]. Перемешивание последовательностей показывает, что повторы не нужны для генерации или распространения прионов и что именно содержание аминокислот в прионном домене (а не в последовательности) определяет, может ли белок образовывать прион [4].

Однако М-домен также оказывает некоторое влияние на поддержание [PSI^+], связываясь с белком Hsp104 — белком теплового шока, который разрезает агрегаты белка Sup35 и таким образом увеличивает их количество. Помимо этого, фрагмент с 124 по 137 остаток необходим для поддержания некоторых из вариантов приона [PSI^+] [2]. Sup35M обогащен заряженными остатками и, как предполагается, помогает поддерживать баланс между агрегированными и неагрегированными состояниями, возможно, посредством взаимодействия с Hsp. [5].

Наименьший фрагмент белка Sup35, способный на поддержание приона, представляет собой участок с 1 по 64 аминокислоту. Он включает в себя участок, богатый глутамином и аспарагином, а также два олигопептидных повтора. Более короткий фрагмент с 1 по 57 аминокислоты сохраняет только способность к агрегации и индукции [PSI^+], но уже с пониженной частотой. Укороченные варианты Sup35p (1-61 аминокислоты) способны образовывать агрегаты *in vitro*, которые также могут индуцировать прион.

Участок олигопептидных повторов белка Sup35 имеет особое значение для поддержания [PSI^+]. Увеличение их количества способствует более интенсивной агрегации белка. Делеция практически всех повторов (с 2-го по 5-ый) имеет прямо противоположный эффект. Уменьшение числа повторов оказывает влияние на фрагментацию прионных агрегатов. Это позволяет предположить, что участок олигопептидных повторов вовлечен в этот процесс и необходим для правильной работы Hsp104p [2].

В последние годы было проведено большое количество исследований, связанных с образованием прионных фибрилл белка Sup35, однако до сих пор не совсем ясно, какой именно участок прионного домена N белка необходим для образования фибрилл. Мутационный анализ белка показал, что половина N-домена (примерно 60 остатков) задействована в получении фенотипа [PSI^+] и формировании фибрилл. Исследования, проведенные с помощью ЯМР в твердом теле, указывают на важность только 30 первых остатков, в то же время, другие исследования на основе того же метода показывают, что в образовании фибрилл участвует весь N-домен и даже часть домена М. Расхождения между экспериментальными данными может быть связано с тем, что образованным белком амилоидным фибриллам присущ полиморфизм. Белок Sup35 может формировать различные фибриллярные структуры в зависимости от различных вариантов приона [PSI^+] [6].

Существование различных прионных «вариантов» или «штаммов» является характерной чертой прионов дрожжей и млекопитающих. Различные штаммы скрейпи, характеризующиеся различным инкубационным периодом и распределением повреждений головного мозга, были известны достаточно давно.

«Варианты» или «штаммы» отвечают одинаковой последовательности прионного белка, однако могут обладать различными биофизическими или биохимическими свойствами, в то время, как прионы, основанные на разных последовательностях белка, есть по сути разные прионы [7].

1.2. Модели структурной организации фибрилл.

Известно, что фибриллы белка Sup35 представляют собой структуры, богатые β -слоями, расположенными примерно перпендикулярно к оси фибриллы. [2] Существует две основных структурных модели фибрилл: модель β -спирали и модель суперскладчатой β -структуры (Рис.2).

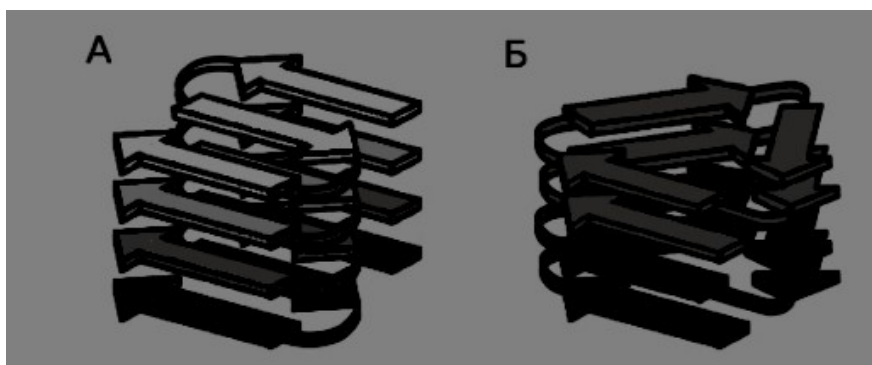


Рис.2. А — суперскладчатая β -структура, Б — β -спираль.[2]

Согласно модели β -спирали слои, образованные N-концевыми участками белка, укладываются по спирали, формируя полые цилиндры, при этом отдельные мономеры связываются друг с другом через соответствующие крайние участки N-доменов, а М-домены не входят в фибриллы. [2] Данные, подтверждающие такую модель, были получены, например, с помощью рентгеноструктурного анализа высушенных и гидратированных образцов, который показал преобладание β -спиралей в гидратированных образцах. [8]

Вторая модель представляет собой N-домены, уложенные в параллельную суперскладчатую структуру, в которой β -слои расположены перпендикулярно к оси фибриллы, а между отдельными мономерами действуют водородные связи, ориентированные параллельно оси. При этом связи осуществляются между полярными аминокислотами, находящимися в одинаковых положениях в белке («в регистре»).[6]

На данный момент эта модель считается наиболее вероятной для белка Sup35, так как она подтверждается значительно большим количеством экспериментальных данных, полученных такими методами как ЯМР в твердом теле [4], сканирующая электронная микроскопия и измерение массы на длину [9], рентгеноструктурный анализ [3] и другие.

Также известно, что структура амилоидной фибриллы зависит от многих внешних факторов, таких как температура, pH системы и других. [10]

1.3. Мутантные аллели белка Sup35.

Различные мутации в гене, кодирующем белок Sup35, приводят к заменам одних аминокислот на другие в определенных положениях и, как известно, по-разному влияют на стабильность фактора *[PSI]*. Первой описанной мутацией типа PNM (от «*[PSI]* по more») является мутация PNM2, которая характеризуется заменой глицина на аспарагиновую кислоту в 58м положении и приводит к полной потере фактора *[PSI]*.

На данный момент описано большое количество мутаций, влияющих на стабильность приона Sup35, в большинстве случаев это мутации, связанные с заменой полярных аминокислот на заряженные, причем в основном расположенные в пределах участка с 1 по 64 аминокислоту, являющегося критическим для поддержания приона, что еще раз подтверждает важность этого участка для поддержания фактора *[PSI]*. Несмотря на это, существуют также и мутации типа PNM, локализованные в С-домеи белка, известно, что они приводят к замедлению процесса формирования агрегатов *in vitro*. [2]

В данной работе исследовались два различных мутантных вида белка Sup35, полученных на биологическом факультете СПбГУ: M0(QQ33 — KK34) и M5(QQ89-90KK), в них осуществлены двойные замены полярных аминокислот на заряженный лизин.

Из ранее проведенных исследований известны некоторые особенности белков с данными мутациями и их агрегации. Было показано что мутация типа M5 не приводит к потере фактора *[PSI]*, что может означать то, что участок, в котором происходит замена, находится за пределами региона, необходимого для поддержания фактора приона. Свойства фактора *[PSI]*, а также свойства образуемых белком агрегатов при этом изменяются. Мутация sup35-M5 приводят к изменению размаха вариации размеров агрегатов Sup35p. Замечено, что фибриллы, образованные Sup35-M5 отличаются большей шириной, чем фибриллы, образованные нативным белком Sup35-WT. Также агрегаты Sup35-M5 характеризуются повышенной термостабильностью по сравнению с агрегатами белка дикого типа. [2]

О поведении и морфологии агрегатов белка Sup35 с мутацией M0(QQ33 — KK34) на данный момент нет определенных данных.

1.4. Работы по исследованию белков с помощью динамического рассеяния света.

Формирование амилоидов различными белками изучалось методом динамического светорассеяния и сравнивалось с результатами, полученными другими методами.

Так, например, полиглутамин как модельная система для хантингтина — белка, ответственного за развитие болезни Хантингтона, и образующего нерастворимые агрегаты, по структуре и цитотоксичности схожие с агрегатами, образующимися в связи с болезнями Альцгеймера и Паркинсона, изучался и помощью динамического рассеяния света. [11]. В данном исследовании, ДРС использовалось как дополнение к методу флуоресценции в присутствии ТиафлавинаТ, так как помимо детектирования фибрилл, ДРС позволяет также детектировать не фибриллярные промежуточные соединения или большие «сборки» из слипшихся фибрилл, что не позволяет флуоресценция. С помощью ДРС определялись гидродинамические радиусы агрегатов. В целом зависимости гидрадинамического радиуса от времени, полученные из ДРС и флуоресценции схожи, однако дают несколько различные значения скорости роста, что связано именно с принципами работы данных методов. Величина сигнала флуоресценции тиафлавина Т несет информацию о числе субъединиц, связывающих краситель, в то время как ДРС дает распределение размеров рассеивающих частиц, а в сигнале преобладают популяции, которые проявляют наибольшее рассеяние, в частности большие или многочисленные агрегаты. В данной работе, полученные с помощью ДРС данные также были обработаны с помощью пакета CONTIN, однако все распределения строились для гидрадинамических радиусов частиц. [11]

Динамическое рассеяние также было использовано при изучении агрегации инсулина, наряду с другими методами. [12] Целью его использования было детектирование интермедиатов и небольших олигомеров. Были построены распределения интенсивности от гидрадинамического радиуса для нескольких дискретных моментов времени, по виду которых определялось наличие мономеров и олигомеров в растворе. Более подробное изучение проводилось уже с помощью других методов, таких, например, как метод кругового дихроизма. [12]

Скорость роста агрегатов изучалась с использованием ДРС также для Амилоида- β , участвующего в образовании агрегатов, связанных с болезнью Альцгеймера. Были получены зависимости гидрадинамического диаметра и интенсивности рассеяния от времени. Гидрадинамический диаметр дает информацию о средних размерах частиц, в то время как интенсивность связана со средней молекулярной массой. Затем данные были обработаны с помощью пакета CONTIN, и получены распределения интенсивности рассеяния по размерам (гидрадинамическим диаметрам). [13]

Таким образом, в большинстве работ, описывающих изучение агрегации различных белков с применением метода динамического рассеяния света, этот метод используется только для определения взвешенных по интенсивностям рассеяния размеров получившихся агрегатов: их гидрадинамических радиусов. Такая практика не позволяет детально изучать агрегацию белков.

В данной работе был применен новый подход к исследованию амилоидных белков методом ДРС, позволяющий получать распределения фибрилл по длинам в разные моменты времени после начала агрегации. Данный подход позволил подробно охарактеризовать процесс фибриллообразования ряда вариантов белка Sup35.

2. Методы исследования фибрилл белка Sup35.

2.1. Атомная силовая микроскопия (АСМ, AFM)

В основе принципа работы атомно-силового микроскопа лежит взаимодействие между поверхностью образца и кантиливером с иглой (зондом) на конце. Сила, которая действует на иглу со стороны поверхности, приводит к изгибу кантиливера, или изменению частоты его колебаний, что в свою очередь фиксируется с помощью датчика, представляющего собой систему из лазера, зеркал и фотоприемника. (Рис.3)

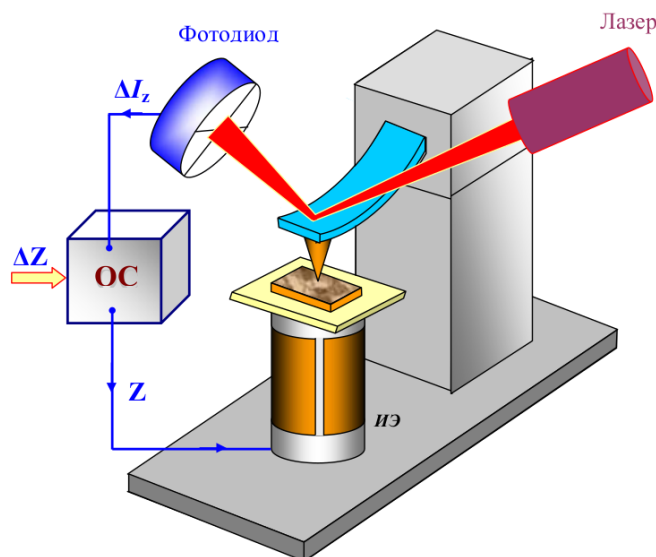


Рис.3.Схема атомно-силового микроскопа с обратной связью.[14]

Преимущества атомно-силовой микроскопии состоят в ее высокой разрешающей способности (до атомных размеров), а также в возможности проведения измерений как для проводящих, так и для непроводящих образцов.

Работу АСМ можно качественно описать, используя силы Ван-дер-Ваальса. При приближении зонда к поверхности действуют силы отталкивания, а при удалении — силы притяжения. (Рис.4)



Рис.4. Вид потенциала Леннарда-Джонса.

Существует несколько основных режимов работы АСМ:

1. Контактный режим.

В контактном режиме работы АСМ зонд и образец находятся в непосредственном контакте, притяжение и отталкивание со стороны поверхности компенсируется силой упругости кантилевера. Система обратной связи в таком режиме осуществляет поддержание постоянной силы взаимодействия между образцом и зондом, то есть постоянного расстояния между ними. Таким образом, траектория движения зонда в точности повторяет рельеф поверхности образца. Контактный режим удобен тем, что дает наилучшее из возможных разрешений, однако при его использовании существует риск повреждения образца, что делает его непригодным для изучения образцов с малой жесткостью, например, ряда органических материалов и биологических объектов, а также повреждения зонда.

2. Бесконтактный режим.

Бесконтактный режим основан на регистрации изменений частоты и амплитуды колебаний кантилевера при его взаимодействии с поверхностью образца. При приближении зонда к поверхности, частота его колебаний изменяется, что позволяет определять расстояние до поверхности и, следовательно, построить ее топографию. В данном режиме полностью отсутствует контакт между зондом и поверхностью, что исключает повреждение образца и иглы, однако разрешение и скорость сканирования меньше, чем в контактном режиме.

3. Полуконтактный режим.

Так как применение бесконтактного режима на практике связано с рядом трудностей и требует большой чувствительности в работе обратной связи, чаще используют полуконтактный режим. Для измерений в этом режиме производится возбуждение вынужденных колебаний кантилевера вблизи резонанса, при этом расстояние между кантилевером и поверхностью устанавливается таким, чтобы в нижнем положении кантилевера зонд касался поверхности образца. При сканировании образца регистрируется изменение амплитуды и фазы колебаний кантилевера. Скорость сканирования в полуконтактном режиме ниже, чем в контактном, однако риск повредить образец или зонд практически исключен. [14]

4. Режим ScanAsyst

В данной работе использовался режим ScanAsyst, который представляет собой усовершенствованную технологию автоматической оптимизации изображений для атомной силовой микроскопии, основанную на технологии PeakForce Tapping компании Bruker.

В PeakForce Tapping колебания производятся на частоте, значительно меньшей резонансной. В отличие от полуконтактного режима, в котором амплитуда и фаза отражают среднее взаимодействие, в данном режиме контролируется мгновенная сила взаимодействия для каждого измерения. В нем используется алгоритм анализа силы взаимодействия в реальном времени, который позволяет удалять паразитное отклонение, за счет чего соотношение сигнал-шум значительно улучшается. PeakForce Tapping позволяет работать при силах взаимодействия до 200 pN, что примерно в пять раз ниже, чем для полуконтактного режима. Это позволяет значительно уменьшить вероятность повреждения образца или иглы, что критично для некоторых биологических образцов. Разрешение в режиме PeakForce при этом настолько же хорошее или лучше, чем в других режимах.

В целом режим ScanAsyst представляет собой технологическое улучшение, сочетающее простоту использования с новыми техническими возможностями и высоким разрешением.

2.2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ, SEM)

В методе сканирующей электронной микроскопии пучок электронов с первичной энергией 1-10 кЭв фокусируется системой линз в пятно диаметром 1-10 нм на поверхности образца, затем этот сфокусированный пучок сканирует поверхность. Производится детектирование различных сигналов, в том числе вторичные электроны, обратнорассеянные электроны, люминесценция и ток через образец. При облучении поверхности пучком электронов

энергией E_0 структура энергетического спектра электронов, испускаемых с поверхности будет следующей: пик упруго рассеянных электронов с энергией E_0 , широкий пик вторичных электронов (от 0 до 50 эВ) и область неупругих обратнорассеянных электронов (от 50 эВ до E_0). Подбирая соответствующие детекторы, можно контролировать сигнал электронов соответствующего энергетического диапазона. Двумерная карта полученного сигнала и представляет собой изображение образца в СЭМ.

Основное применение сканирующей электронной микроскопии связаны с визуализацией топографии и карты распределения элементов на поверхности. СЭМ позволяет получать изображения с высоким пространственным разрешением, так как в отличие от оптических микроскопов, разрешающая способность которых ограничена длиной волны фотонов видимого света, в нем используется пучок электронов со значительно меньшей длиной волны. Разрешающая способность СЭМ зависит от диаметра электронного пучка и от размера области взаимодействия зонда с образцом и может составлять от десятков нанометров до доли нанометра. [15]

Основные элементы сканирующего электронного микроскопа — электронная пушка и электронная колонна, которые создают сфокусированный пучок электронов на поверхности образца, вакуумная система, предметный столик, который позволяет перемещать образец в трех направлениях.

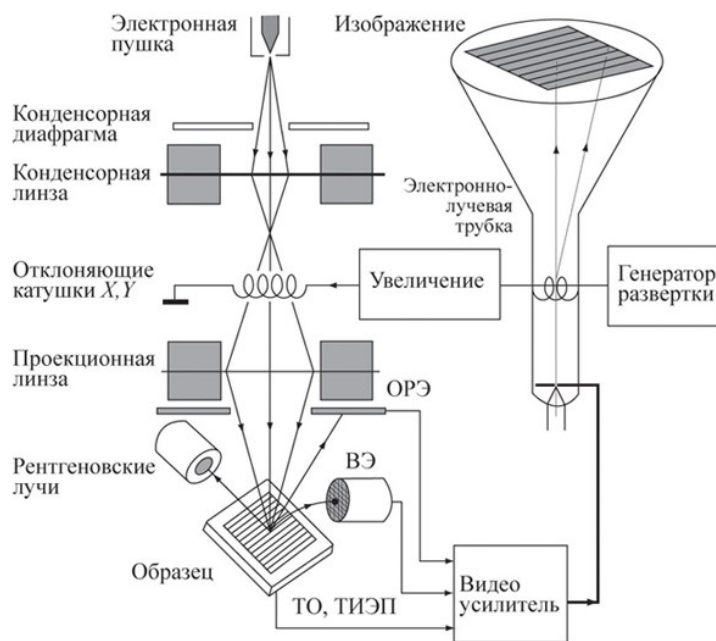


Рис. 5. Схематическая диаграмма устройства сканирующего электронного микроскопа.[15]

2.3. Динамическое рассеяние света.

Динамическое рассеяние света - это оптический метод, который позволяет определять коэффициенты вращательной и поступательной диффузии несферических частиц в газах и растворах и затем, зная форму частиц, рассчитывать размеры частиц. Он широко используется для анализа растворов макромолекул и коллоидных систем.

В экспериментах по светорассеянию луч лазера проходит через поляризатор для определения поляризации падающего света, а затем попадает в рассеивающую среду образца (Рис.6.). После образца свет проходит через анализатор, который пропускает только определенную поляризацию, и затем попадает на детектор. Положение детектора определяет угол рассеяния, равный θ° , а пересечение падающего пучка света и пучка, захваченного детектором, определяет область рассеяния объема V .

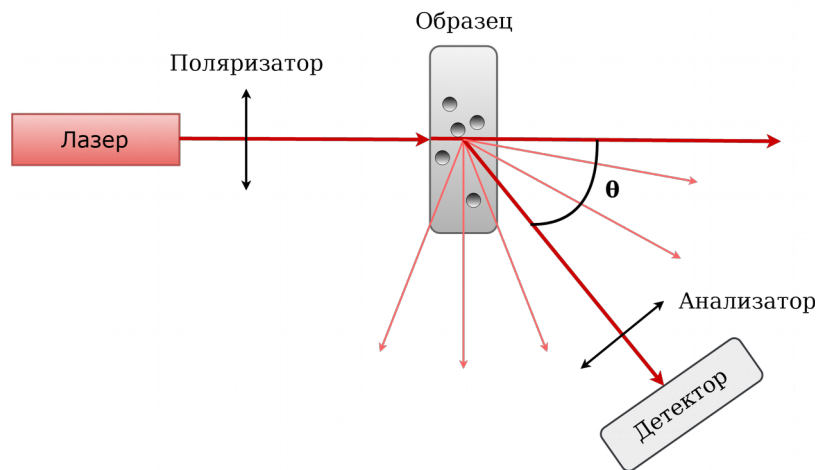


Рис. 6. Схема установки динамического рассеяния света.

Величины, измеренные в экспериментах по рассеянию света, являются временными корреляционными функциями рассеянного поля или интенсивности рассеяния (или их спектральных плотностей). Следовательно, корреляционные функции и их спектральные плотности являются центральными для понимания рассеяния света. [16]

Временная автокорреляционная функция $G(\tau)$ для любой функции $x(t)$ определяется соотношением:

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t)x^*(t+\tau)dt = \langle x(t)x^*(t+\tau) \rangle$$

где $x(t)$ — значение функции в момент времени t , а $x^*(t+\tau)$ — комплексно-сопряженное значение функции в момент времени $t+\tau$; угловые скобки означают усреднение по времени.

Автокорреляционная функция представляет собой функцию независимой переменной τ . Спектральную плотность интенсивности рассеянного света можно найти с помощью фурье

преобразования соответствующей пространственно-временной функции рассеивающей системы:

$$I(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) \exp(i\omega\tau) d\tau$$

Контур спектральной линии $I(\omega)$ представляет собой лоренциан, центрированный относительно частоты ω_0 . Полуширина лоренцева контура $(\Delta\omega)/2 = (\omega - \omega_0) / 2$ связана с коэффициентом поступательной диффузии D соотношением:

$$(\Delta\omega)/2 = q^2 D$$

где q — волновой вектор, определяемый соотношением:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Здесь n_0 — показатель преломления среды, λ_0 — длина волны падающего излучения в вакууме, θ — угол рассеяния. [17]

После определения коэффициентов диффузии необходимо сопоставить им определенные длины и диаметры фибрилл, а по соответствующим интенсивностям рассеяния определить концентрацию таких фибрилл.

Важным параметром при сборе экспериментальных данных является разрешающая способность метода, которая в данном случае зависит от времени накопления автокорреляционных функций и качества сигнала. С увеличением времени накопления АКФ растет сигнал, однако так же увеличивается вероятность появления шумов, связанных с появлением в растворе различных загрязнений и крупных агрегатов. Исходя из этих соображений время накопления АКФ было выбрано равным одной минуте, так как при этом времени соотношение сигнал-шум оптимально. Интенсивность сигнала зависит от количества рассеивателей в объеме, то есть от концентрации белка. Она составляла от 0,05 до 0,5 мг/мл.

2.4. Программная обработка данных динамического светорассеяния.

Для обработки полученных с помощью ДРС автокорреляционных функций использовалась сторонняя программа (автор — Соколов Петр Александрович), так как программа DynaLS, идущая в комплекте с оборудованием не позволяет производить полноценную обработку результатов.

Эта программа позволяет:

1. Провести фильтрацию автокорреляционных функций (АКФ) по задаваемым вручную параметрам и провести усреднение АКФ.
2. Полученные АКФ перевести в зависимости интенсивности I от коэффициентов диффузии D - $I(D)$ при помощи алгоритма CONTIN [18]. Получить единый файл,

содержащий последовательность распределений интенсивности рассеяния по коэффициентам диффузии — $I(D)$ для разных моментов времени, удобный для анализа и построения графиков.

3. Перейти от коэффициентов диффузии D к размерам L и построить распределения интенсивности для них — $I(L)$
4. Перейти от распределений $I(L)$ к распределениям условных концентраций фибрилл C по их длинам L — $C(L)$

Конечным результатом обработки является трехмерный график, по оси X которого отложено время, по оси Y — длины фибрилл, а по оси Z — концентрации фибрилл соответствующего размера.

Рассмотрим механизм обработки подробнее:

1. Автокорреляционные функции накапливались в течение одной минуты каждая. Фильтрация заключалась в том, чтобы отбросить АКФ, соответствующие различным выбросам, то есть шумам. Это производилось с помощью различных параметров: 1) Указывая время начала, длительность и период работы магнитной мешалки, можно сразу избавиться от выбросов, связанных с перемешиванием; 2) Отбрасывая АКФ, значение которых не стремилось к нулю с ростом времени автокорреляции, то есть с номером канала; 3) Устанавливая пределы среднего значения интенсивности, отбрасываются АКФ, соответствующие, например, выниманию образца, так чтобы при этом не происходило удаления соседних АКФ; 4) Удалялись АКФ, для которых в процессе измерения моментальное значение интенсивности рассеяния превышало свое среднемедианное значение в заданное число раз; 5) Удалялись АКФ, для которых интенсивность превышала среднемедианное значение средней интенсивности по 32 соседним функциям в заданное число раз. При этом при фильтрации составляется зависимость интегральной интенсивности от времени, по виду которой можно оценить количество шумов и подобрать наиболее подходящие параметры фильтрации.

Далее, усреднение АКФ проводилось следующим образом: если имеется последовательность АКФ: AKF_i , AKF_{i+1} , AKF_{i+2} отвечающих i , $i+1$, $i+2$ минуте с начала агрегации, и если усреднение проводится по две АКФ, то каждая усредненная АКФ вычисляется как $\langle AKF_i \rangle = (AKF_i + AKF_{i+1})/2$. Усреднение проводится для каждого времени автокорреляции по отдельности. В результате получается набор усредненных АКФ: $\langle AKF_i \rangle$, $\langle AKF_{i+1} \rangle$, $\langle AKF_{i+2} \rangle$ и тд. При обработке результатов усреднение проводилось по разному числу соседних АКФ (от 1 до 256), но почти во всех случаях в итоге было выбрано усреднение по 4 или 8 АКФ, так как оно дает

наилучшее соотношение сигнал-шум, в то время как для меньшего количества усреднений в полученных распределениях присутствует слишком большое количество выбросов, а для очень большого количества усредняемых функций производится чрезмерное сглаживание.

2. Полученный набор усредненных АКФ далее обрабатывался с помощью программного пакета CONTIN и преобразовывался в распределения относительной интенсивности рассеяния по коэффициентам поступательной диффузии частиц, то есть набор $\langle \text{АКФ}_i \rangle$, $\langle \text{АКФ}_{i+1} \rangle$, $\langle \text{АКФ}_{i+2} \rangle$ преобразовывался в набор распределений $I_i(D)$, $I_{i+1}(D)$, $I_{i+2}(D)$.
3. После того, как были получены зависимости $I(D)$ для разных моментов времени, необходимо сопоставить коэффициентам диффузии размеры частиц — длины фибрилл L , то есть каждое $I_i(D)$ преобразовать в $C_i(L)$. Для этого сначала на основе зависимости $L(D)$ проводилось преобразование $I_i(D)$ в $I_i(L(D))$, затем, переход от $I_i(L)$ к $C_i(L)$, для которого нужно учитывать зависимости дифференциального сечения рассеяния (DSCS) от длины фибрилл (расчет зависимости $L(D)$ и дифференциальных сечений рассеяния приведен ниже). Так как интенсивность рассеяния $I_i(L)$ пропорциональна произведению $C_i(L)$ на DSCS(L) для каждого угла рассеяния, то каждую точку распределения $I_i(L)$ нужно разделить на соответствующее дифференциальное сечение рассеяния DSCS(L) для данного угла рассеяния.

Расчет коэффициентов диффузии фибрилл проводился теоретически и численно. Теоретический расчет предполагает ряд приближений, таких как отсутствие влияния концевых эффектов для модели жестких и червеобразных цилиндров, однако для цилиндров, длина которых сопоставима или меньше диаметра, учет влияния концевых эффектов необходим. Таким образом, различные диапазоны длин исследовались по-разному:

- 1) Для длин 0,47 — 100 нм проводился теоретический расчет и численный с помощью программы HYDROPIX. (0,47 нм — толщина одного мономера в составе фибриллы)
- 2) 100 — 200 нм — только теоретический расчет, так как численный невозможен для длин, превышающих 100 нм ввиду программных ограничений. В этой области использовалось приближение нестигаемых цилиндров.
- 3) 200 — 100000 нм — теоретический расчет в приближении червеобразных цилиндров с персистентной длиной 1000 нм.

Диаметр фибрилл был выбран равным 9,67 нм — это условная величина, соответствующая средней плотности белка 0,73-0,74 мг/мл [22], при условии, что внутри фибрилл нет пустот и она имеет круглое сечение. Результирующая гладкая зависимость $D(L)$

представлена на Рис.7, она и была использована для перевода коэффициентов диффузии в длины фибрилл.

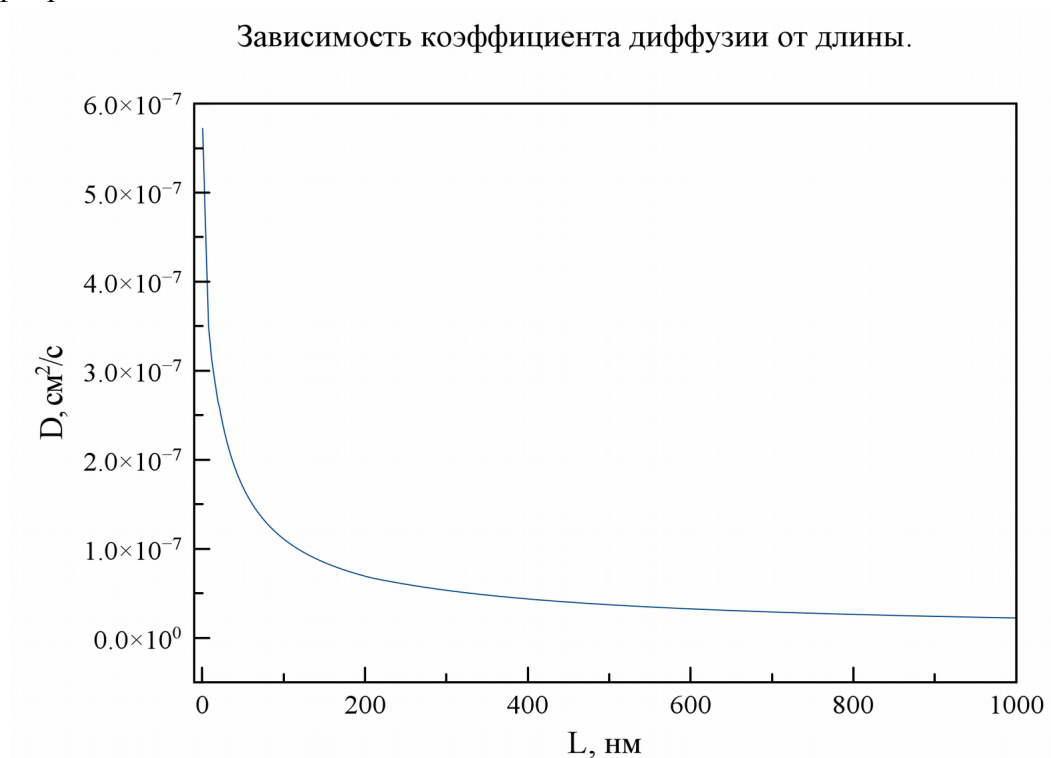


Рис. 7. Составная зависимость коэффициента поступательной диффузии от длины цилиндра диаметром 9,67 нм. (Данные предоставлены Соколовым П. А.)

Расчет дифференциальных сечений рассеяния (DSCS) производился с помощью программы NFM-DS (подробнее - <https://scattport.org/index.php/programs-menu/t-matrix-codes-menu/239-nfm-ds>), которая осуществляет расчет Т-матриц при заданной геометрии рассеивателя, его ориентации (все расчеты были сделаны для усредненной по всем углам ориентации фибрилл), длины лазера и показателей преломления фибрилл и растворителя. При этом отдельно проверялась сходимость Т-матриц для каждой конфигурации.

Метод Т-матриц, впервые описанный Уотерманом (Waterman P.C.) [19] - один из наиболее мощных и широко используемых методов для проведения строгих расчетов рассеяния света резонансными несферическими частицами, как одиночными, так и агрегатами, состоящими из множества частиц.

Для описания рассеяния света от одиночной частицы вводится сферическая система с началом координат внутри частицы. Рассматривается плоская электромагнитная волна, падающая на частицу и рассеянная волна, которая будет являться сферической. В таком случае, согласно уравнениям Максвелла и граничным условиям, связь между коэффициентами рассеянного поля и падающего поля линейна и задается с помощью матрицы перехода (Т-матрицы) следующим образом:

$$\begin{bmatrix} p \\ q \end{bmatrix} = T \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} T^{11} & T^{12} \\ T^{21} & T^{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix}$$

где p, q — коэффициенты рассеянной волны; a, b — коэффициенты падающей волны

Важной особенностью метода Т-матриц является то, что элементы матрицы не зависят ни от падающей, ни от рассеянной волны, а определяется только размерами, формой, индексом отражения рассеивающих частиц и их ориентацией относительно системы координат. Таким образом, Т-матрицу требуется рассчитать однократно, и потом она может применяться для расчетов при любых направлениях падающей и рассеянной волн. [20]

С помощью использованной программы производился расчет Т-матриц для ряда различных показателей преломления фибрилл. В результате можно построить зависимость DSCS(L) (Рис.8) в широких диапазонах показателей преломления фибрилл и среды для любых углов. В дальнейшем для перевода $I(L)$ в $C(L)$ использовались DSCS для фибрилл диаметром 9.67 нм, с показателем преломления 1.62. Показатель преломления фибрилл был рассчитан теоретически в предположении, что показатель преломления фибрилл мало отличается от показателя преломления мономерного белка, однако этот расчет дает значение, существенно превышающее показатели преломления для других белков, поэтому также в нашей лаборатории был проведен экспериментальный расчет, давший оценку показателя преломления $1,62 \pm 0,01$

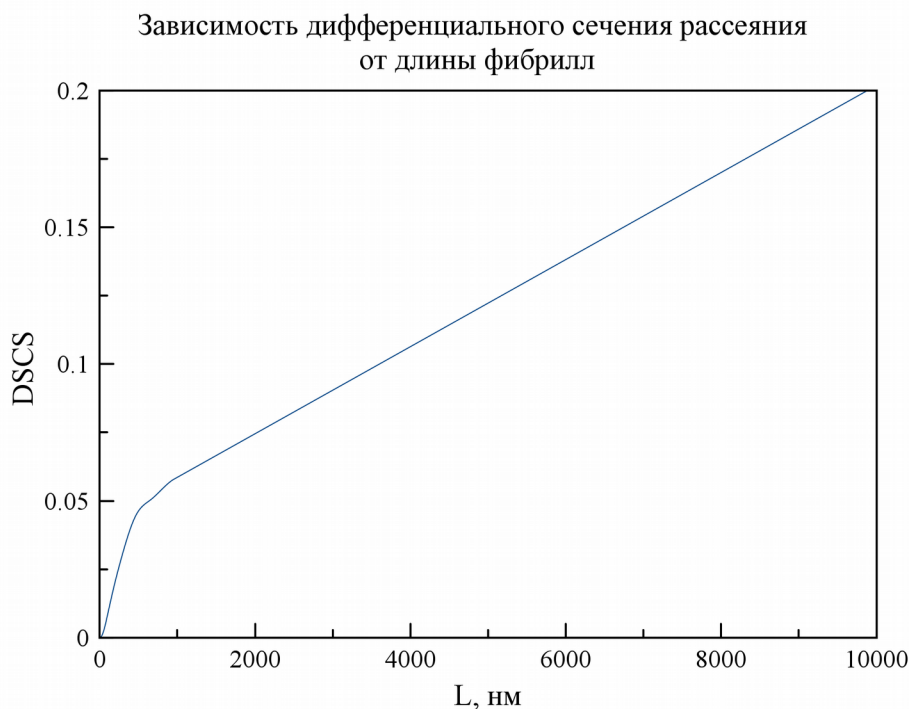


Рис.8. График зависимости дифференциального сечения рассеяния DSCS от длины фибрилл L . (Данные предоставлены Соколовым П. А.)

3. Материалы и приготовление образцов.

3.1. Материалы.

В работе использовался дрожжевой белок Sup35:

1. Sup35-WT — дикий тип (10 мкл белка концентрацией 50 мг/мл в буфере G)
2. Sup35-M5 (14 мкл белка концентрацией 43 мг/мл в буфере G)
3. Sup35-74 - N-домен + 6 а.к. (5 мкл белка концентрацией 50 мг/мл в буфере G).

Эти образцы белка в последствии переводились в концентрацию 25 мг/мл в буфере G.

4. Sup35-M0 (15 мкл концентрацией 50-100 мг/мл в буфере G)

Все белки были получены на кафедре генетики биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета группой Г. А. Журавлевой. Для инициации процесса агрегации белок переводился из буфера G (8 М гуанидин гидрохлорид, денатурант, препятствующий процессу агрегации), в фосфатный буфер F (5мМ фосфат калия, 150 мМ NaCl, pH = 7,4).

3.2. Фильтрация раствора белка.

Фильтрация производилась с помощью центрикона на 50 или 100 кДа в центрифуге. При этом методика была следующей:

1. Если центрикон был заполнен глицерином, предохраняющим его от высыхания, то он выливался.
2. Центрикон откручивался на центрифуге в перевернутом положении: $t = 1$ мин, 1000 g
3. В обычном положении центрикон заполнялся 400 мл воды и откручивался на центрифуге: 14000 g, $t = 1$ мин
4. Пункты 2 и 3 повторялись три раза для полного очищения центрикона.
5. Центрикон заполнялся 400 мл буфера F и откручивался на центрифуге при 14000g до полного прохождения буфера через фильтр. Отфильтрованный буфер выливался.
6. Пункт 5 повторялся, полученный отфильтрованный буфер переливался в отдельную кювету и использовался для приготовления раствора белка.
7. Раствор белка фильтровался при 14000g до полного прохождения раствора через фильтр (примерно 10 мин) и переливался в отдельную кювету.
8. Центрикон промывался (пункты 2-4) и заливался глицерином.

3.3. Приготовление кювет для динамического светорассеяния.

Кюветы для ДРС предварительно очищались следующим образом:

1. Кюветы протирались спиртом

2. Промывались водой в течение нескольких минут
3. Заполнялись хромовой смесью на 10-15 минут
4. Промывались водой
5. Очищались в ультразвуковой ванне в течение 5 минут
6. Промывались водой
7. Оставлялись в обеспыленном боксе
8. Если использовалась магнитная мешалка, то магнитный якорь также промывался спиртом, водой и очищался в ультразвуковой ванне.

3.4. Приготовление растворов белка.

Для приготовления образца белка растворяли в фосфатном буфере F, перемешивали и оставляли на 5-10 минут для полного смешивания, полученный раствор фильтровали через центрикон согласно 3.2, и затем в обеспыленном боксе переливали в предварительно очищенные кюветы для ДРС. После этого кювету закрывали, заклеивали парафиновой пленкой и помещали в установку ДРС на несколько часов.

Соотношения объемов были следующими:

1. Sup35-M0: 1) 2 мкл белка на 400 мкл фосфатного буфера. Конечная концентрация белка – 0,25-0,5 мг/мл
2) 7 мкл белка на 400 мкл фосфатного буфера – 0,8 – 1,7 мг/мл
2. Sup35-M5: 3 мкл белка на 300 мкл буфера – 0,25 мг/мл
3. Sup35-WT: 3 мкл белка на 300 мкл буфера – 0,25 мг/мл
4. Sup35-74: 1) 3 мкл белка на 300 мкл буфера - 0,25 мг/мл
2) 1,5 мкл белка на 300 мкл буфера – 0,0125 мг/мл

3.5. Подготовка образцов для АСМ и СЭМ.

1. На подложку наклеивался двухсторонний скотч
2. На скотч приклеивался небольшой кусок слюды (для АСМ) или кремния (для СЭМ)
3. Для АСМ с поверхности слюды скотчем скалывалось несколько слоев для обеспечения гладкости поверхности.
4. На поверхность образца наносится 10 мкл раствора с помощью дозатора и оставляется на 1 минуту
5. Поверхность образца промывается дистиллированной водой и высушивается с помощью груши потоком воздуха, направленным перпендикулярно поверхности образца.
6. Полученные образцы помещаются в закрытую чашку Петри до их исследования.

4. Результаты и обсуждение.

4.1. Изучение агрегации белка Sup35-M0

Две агрегации белка Sup35-M0 были изучены с помощью динамического рассеяния света. По полученным данным, используя разработанную программу (2.4.), были построены распределения фибрилл по размерам и концентрациям от времени.

Агрегация №1.

До центрифугирования проводилось перемешивание магнитной мешалкой каждые 10 минут в течение одной минуты. Было взято несколько проб на СЭМ в разные моменты времени с начала агрегации: $t = 4020$ с — проба №1 (Рис.10), $t = 5640$ с — проба №2 (Рис.11), $t = 70380$ с — проба №3 (Рис.12). Проба №4 была взята сразу после центрифугирования, в момент времени $t = 15600$ с (Рис.13)

Время накопления АКФ составляло 1 минуту; усреднение проводилось по различному количеству соседних АКФ (от 1 до 128), из которых наилучшее соотношение сигнал-шум дало усреднение по 4 соседних АКФ, которое и было выбрано в последствии.

Из Рис. 9 можно видеть, что начиная примерно с 5000 секунд появляется пик, отвечающий размерам фибрилл около 1000 нм, который затем становится ярче — концентрация фибрилл данного размера растет. Начиная с этого момента и до центрифугирования замечен также небольшой пик, отвечающий фибриллам размерами до 100 000 нм. По данным микроскопии таких длинных фибрилл в растворе нет, но встречаются клубки из сотен коротких фибрилл. Это позволяет предположить, что именно клубки из фибрилл соответствуют данному диапазону длин фибрилл. Пик пропадает после центрифугирования, так как при центрифугировании лучше всего осаждаются именно самые большие агрегаты. Крупные агрегаты вносят большой вклад в интенсивность рассеяния, которая после центрифугирования падает почти в 2 раза. Однако затем, начиная примерно с 20000 секунд этот пик появляется снова, при этом интенсивность рассеяния растет незначительно, т.е. вновь идет образование крупных агрегатов. Концентрация небольших фибрилл размерами до 10-30 нм и мономерного белка на протяжении всей агрегации остается высокой и не поддается точному анализу. Основной пик, отвечающий фибриллам длиной порядка 1000 нм остается и после центрифугирования. К концу агрегации интенсивность данного пика падает, что может быть связано с образованием более крупных агрегатов.

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

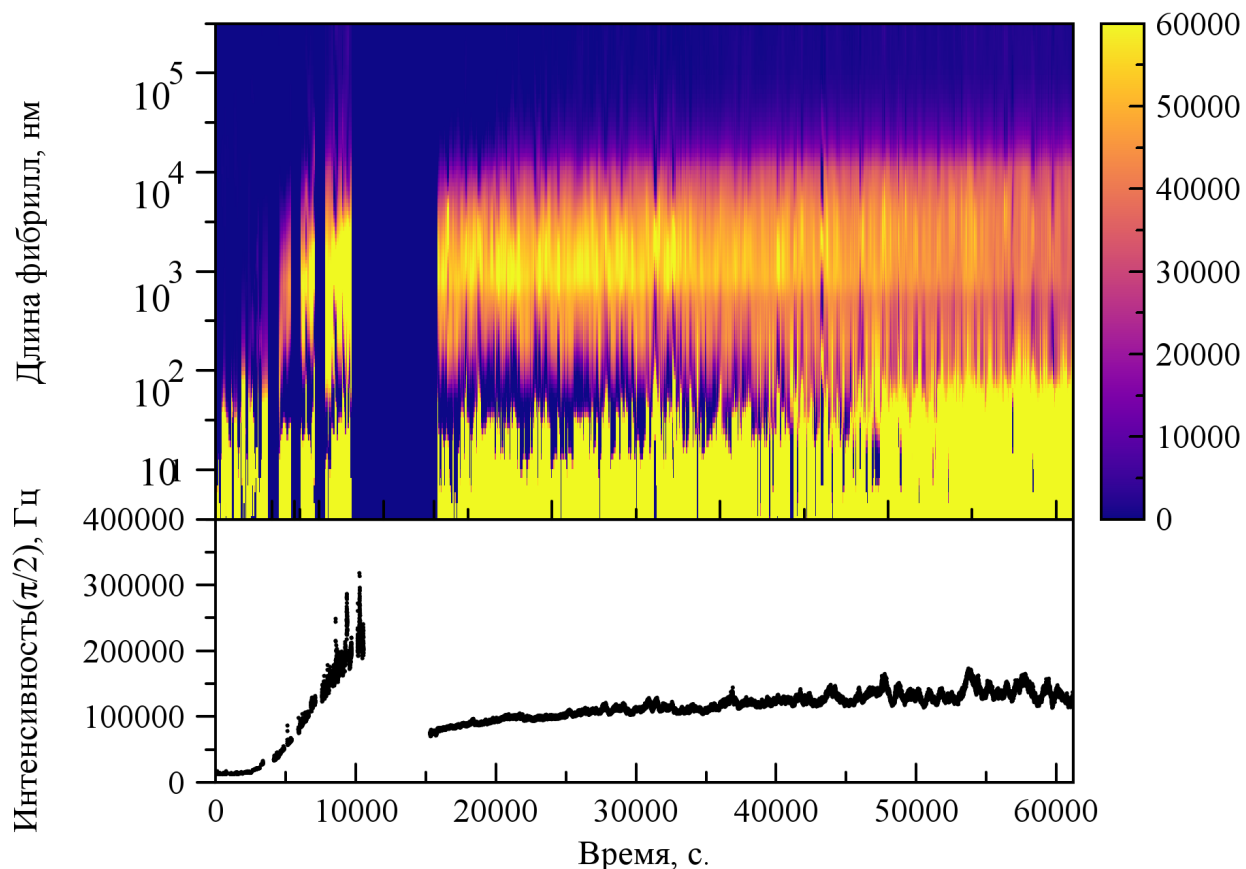


Рис. 9. Сверху представлена зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-M0 от времени агрегации. Снизу показана соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

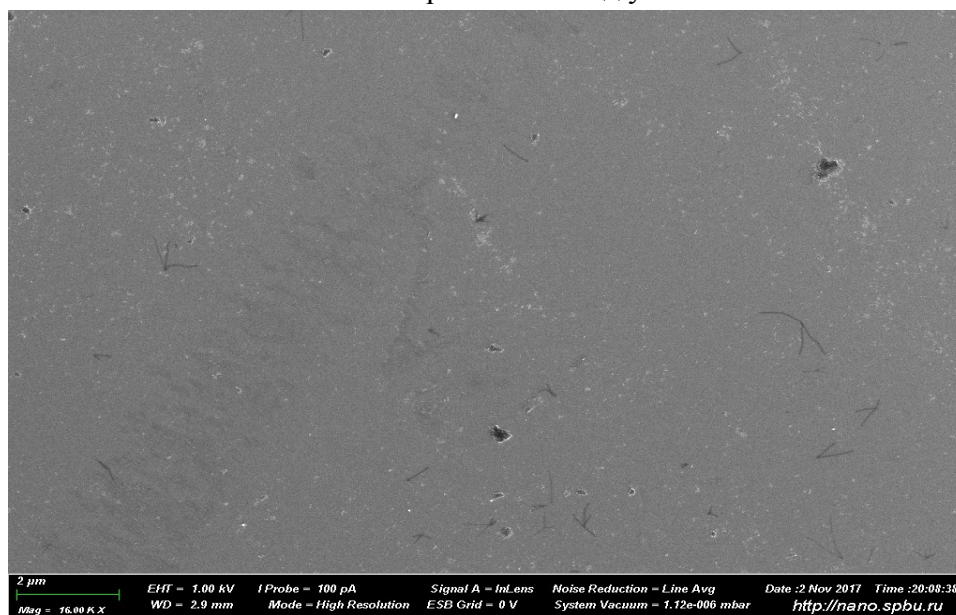


Рис.10. СЭМ изображение пробы белка Sup35-M0, взятой в момент времени $t = 4020$ с после начала агрегации

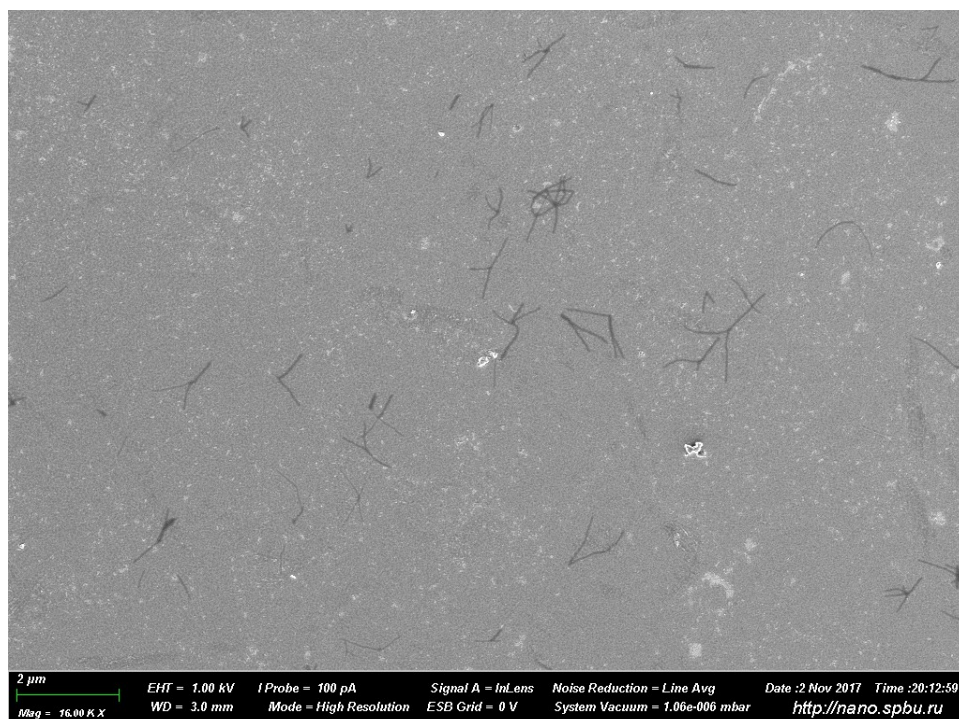


Рис.11. СЭМ изображение пробы белка Sup35-M0, взятой в момент времени $t = 5640$ с после начала агрегации

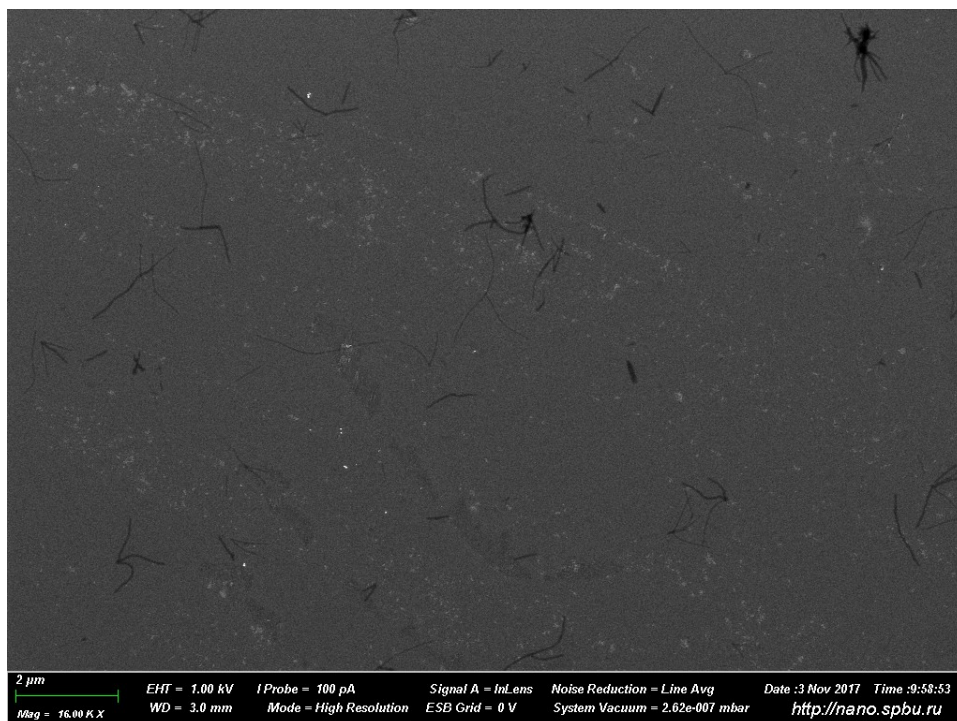


Рис.12. СЭМ изображение пробы белка Sup35-M0, взятой в момент времени $t = 70380$ с после начала агрегации.

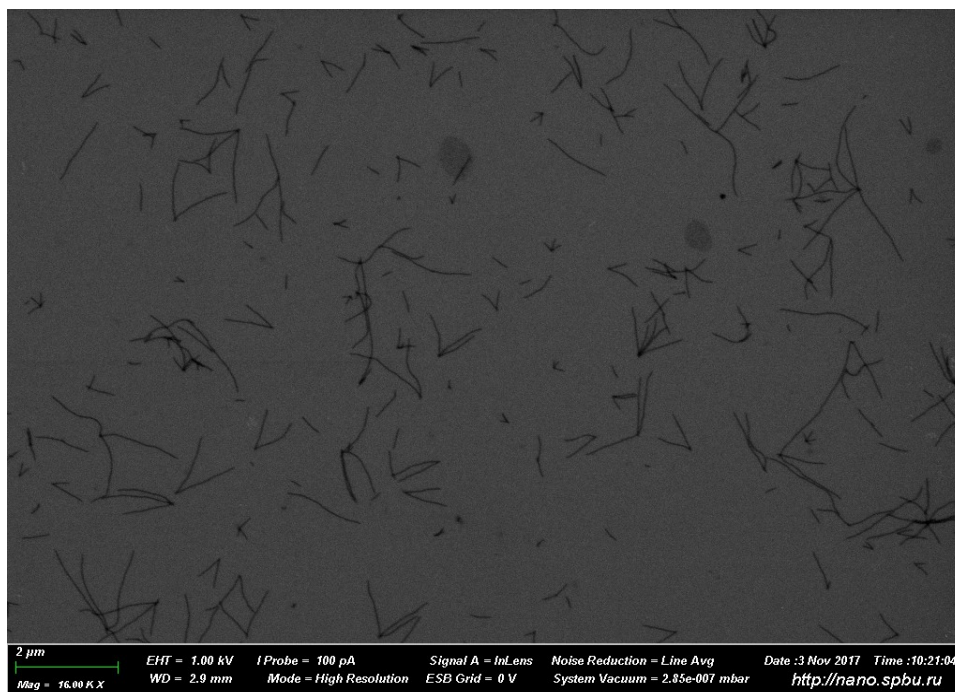


Рис.13. СЭМ изображение пробы белка Sup35-M0, взятой в момент времени $t = 15600$ с после начала агрегации

Была произведена обработка полученных изображений СЭМ. С помощью программы ImageJ были посчитаны длины фибрилл и построены гистограммы их распределения по длинам. После этого было произведено сравнение полученных распределений с распределениями, полученными из данных динамического рассеяния света, соответствующих первым трем минутам после возвращения образца в установку для измерения ДРС.

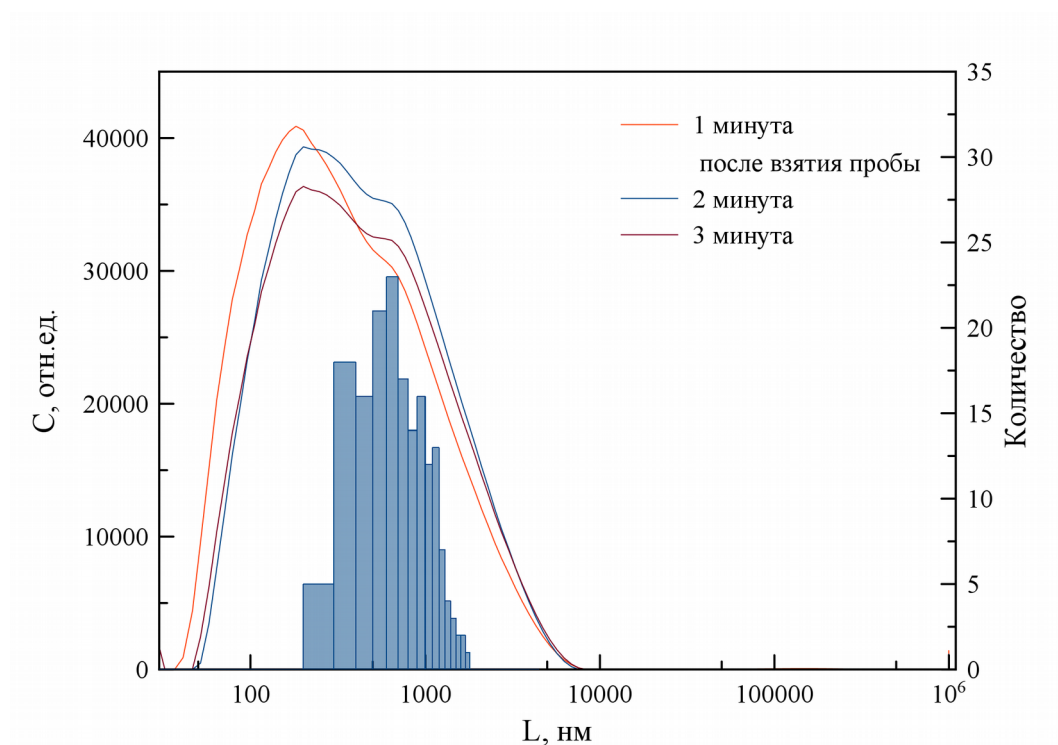


Рис. 14. Сравнение результатов СЭМ и ДРС для Sup35-M0 для пробы №1

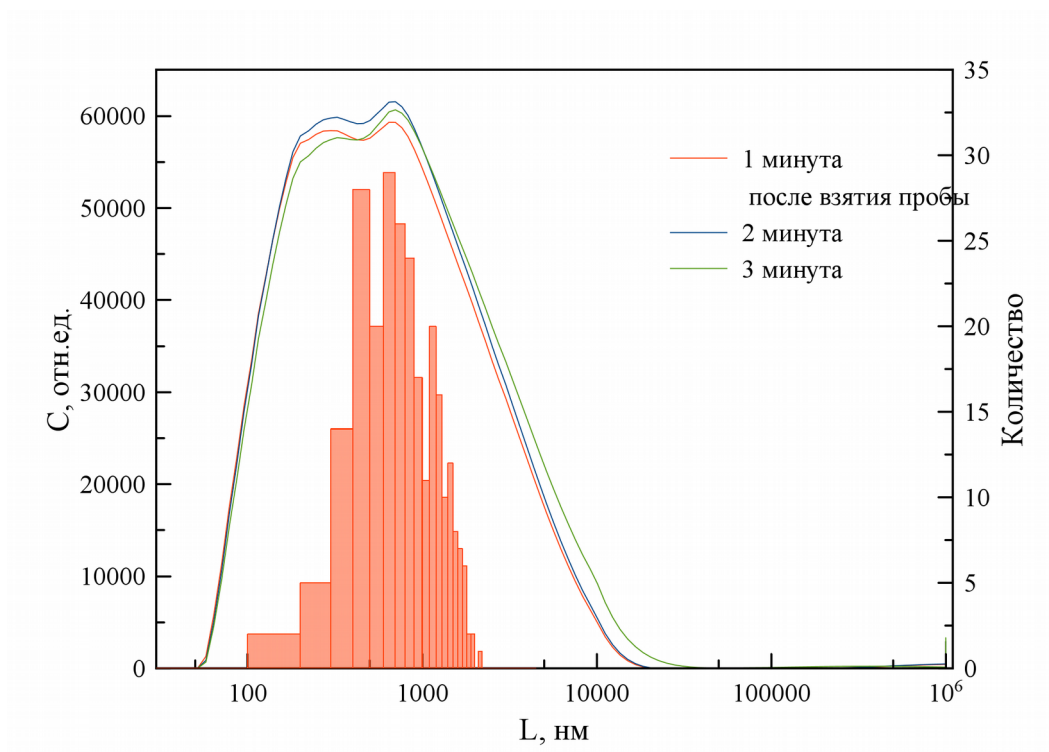


Рис. 15. Сравнение результатов СЭМ и ДРС для Sup35-M0 для пробы №2

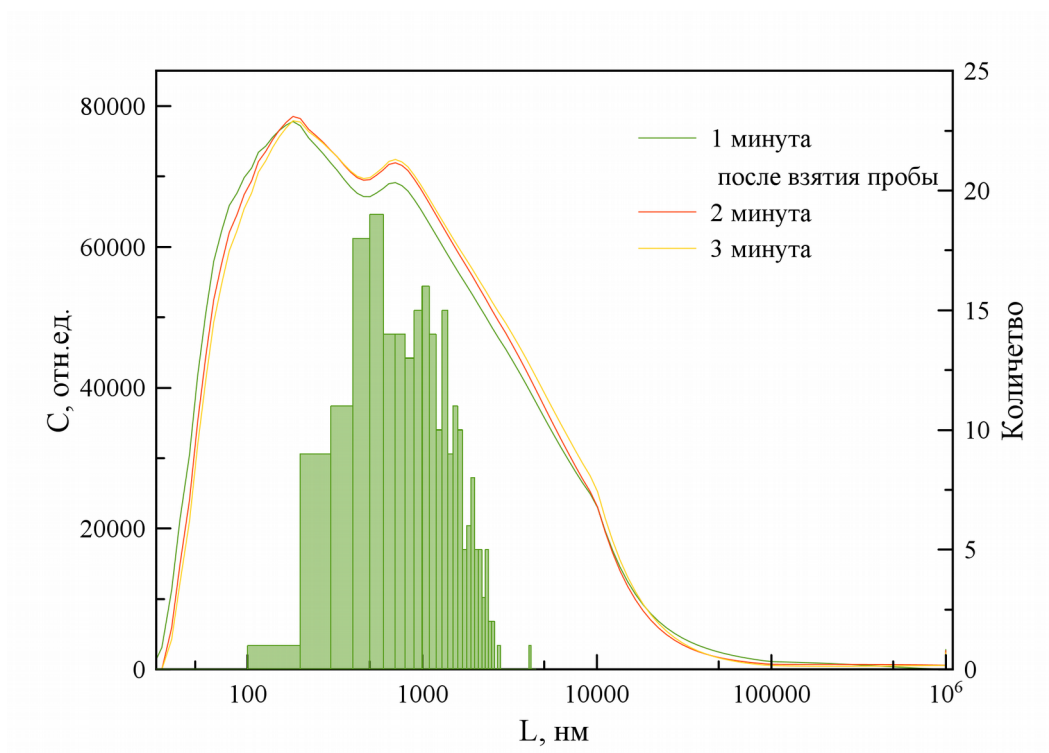


Рис. 16. Сравнение результатов СЭМ и ДРС для Sup35-M0 для пробы №3

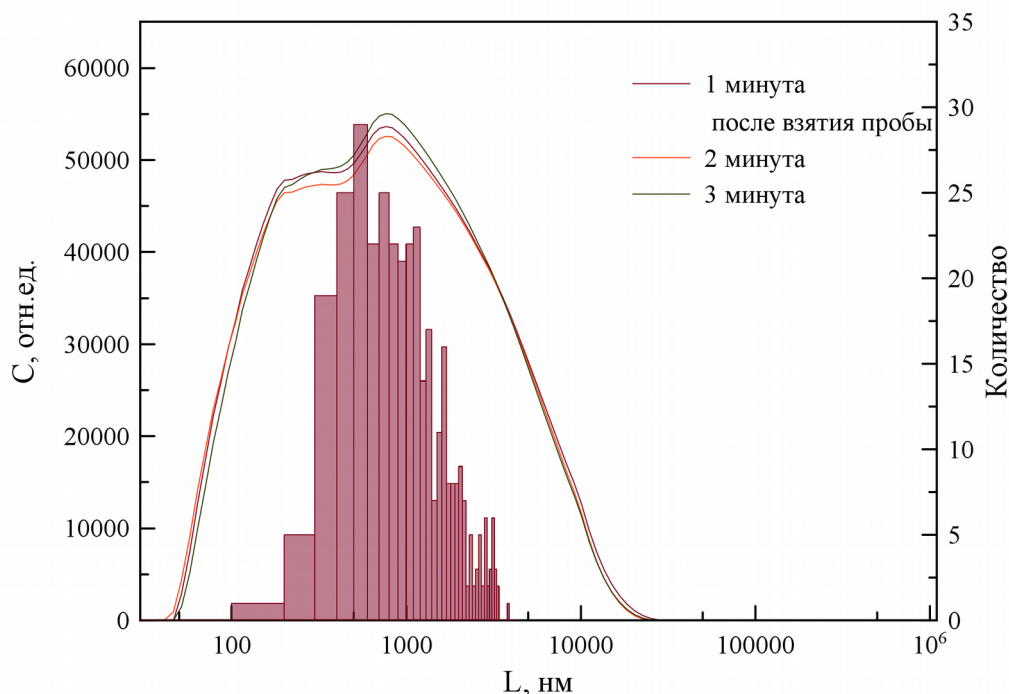


Рис. 17. Сравнение результатов СЭМ и ДРС для Sup35-M0 для пробы №4

В целом распределения, полученные с помощью ДРС и СЭМ коррелируют, что доказывает достоверность данных ДРС. Имеются однако и различия, такие как ширина распределения или высота определенных пиков, но эти различия объясняются техническими трудностями при анализе изображений СЭМ: очень мелкие агрегаты зачастую невозможно детектировать или отличить от неровностей подложки, а очень длинные фибриллы запутываются или пересекаются, так что однозначно выделить и рассчитать длину отдельных фибрилл также затруднительно. Помимо этого, количество данных, анализируемое в ДРС значительно выше, чем для микроскопии, что также может приводить к некоторым различиям.

Агрегация №2.

Перемешивание магнитной мешалкой проводилось по 1 минуте каждые 10 минут до первого центрифугирования.

Центрифугирование проводилось два раза на 6400g в течение примерно 30 минут. Видно, что как и в первой агрегации агрегаты длинами до 100 нм присутствуют в высоких концентрациях на протяжении всего времени агрегации, также уже через 5000 секунд с начала агрегации заметен небольшой пик, соответствующий размерам около 1000 нм, причем этот пик не только не пропадает, но и становится более интенсивным после первого центрифугирования. Концентрация фибрилл, соответствующая данному пику со временем растет, максимум пика сдвигается в область длин порядка 3000 нм. После второго

центрифугирования также не наблюдается уменьшения концентрации крупных фибрилл, напротив в конце агрегации наблюдается большая концентрация фибрилл длинами порядка от 3000 до 10000 нм. Таким образом, центрифугирование в данной агрегации не привело к осаждению крупных агрегатов, что может быть связано с тем, что длительность центрифугирования была недостаточна или с тем, что фибриллы длинами около 3000 нм осаждаются гораздо хуже, чем длинами порядка 10 000 — 100 000 нм, как в агрегации №1.

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

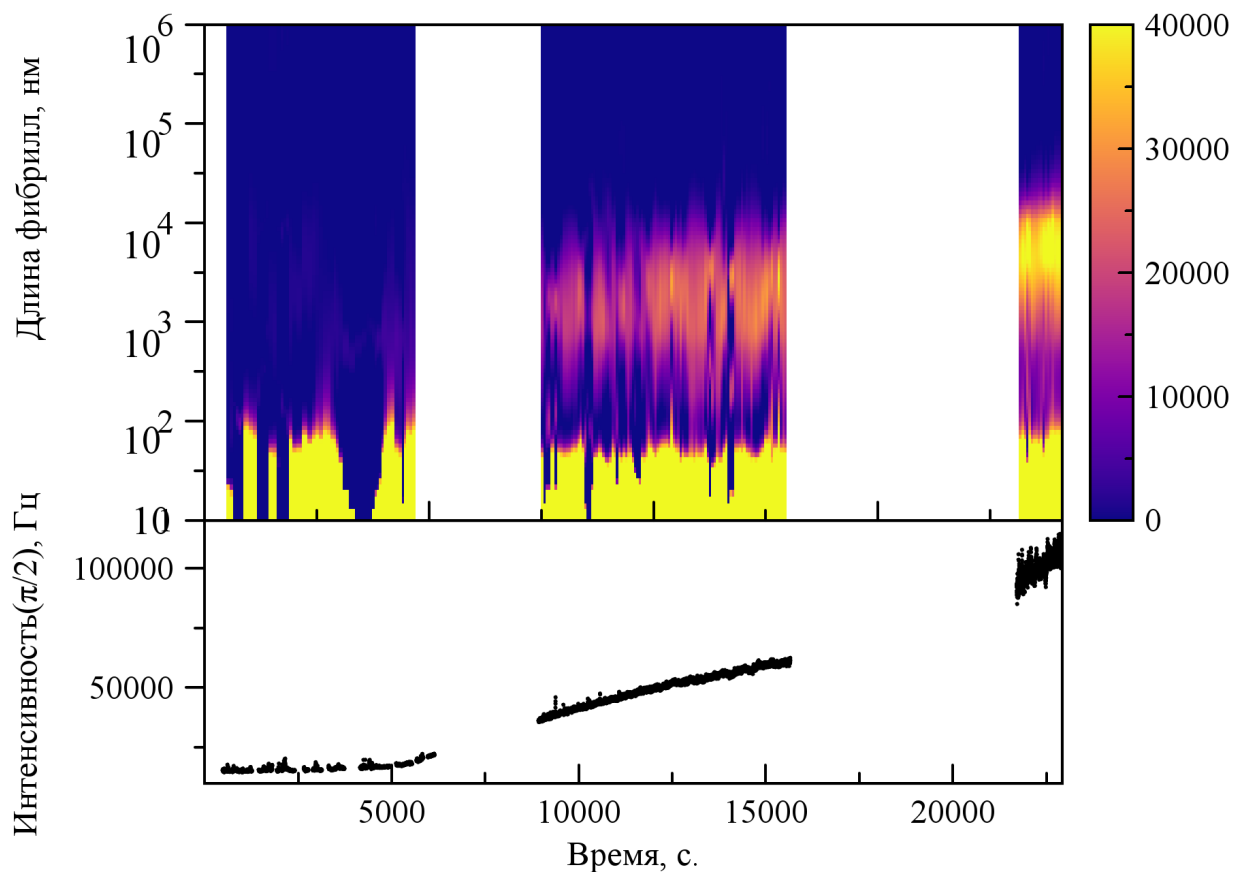


Рис. 18. Сверху представлена зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-M0 от времени агрегации. Снизу показана соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

4.2. Изучение агрегации белка Sup35-WT

В течение агрегации проводилось перемешивание магнитной мешалкой с периодичностью 10 минут в течение одной минуты. Усреднение по 4 соседним АКФ.

В распределении преобладают не очень большие фибриллы, размерами до 1000 нм, максимальный размер фибрилл — около 3000 нм (Рис.20). Очень больших агрегатов не наблюдается. Проба на АСМ была взята через два часа после начала агрегации, то есть в момент $t = 7200$ с (Рис.21-22)

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

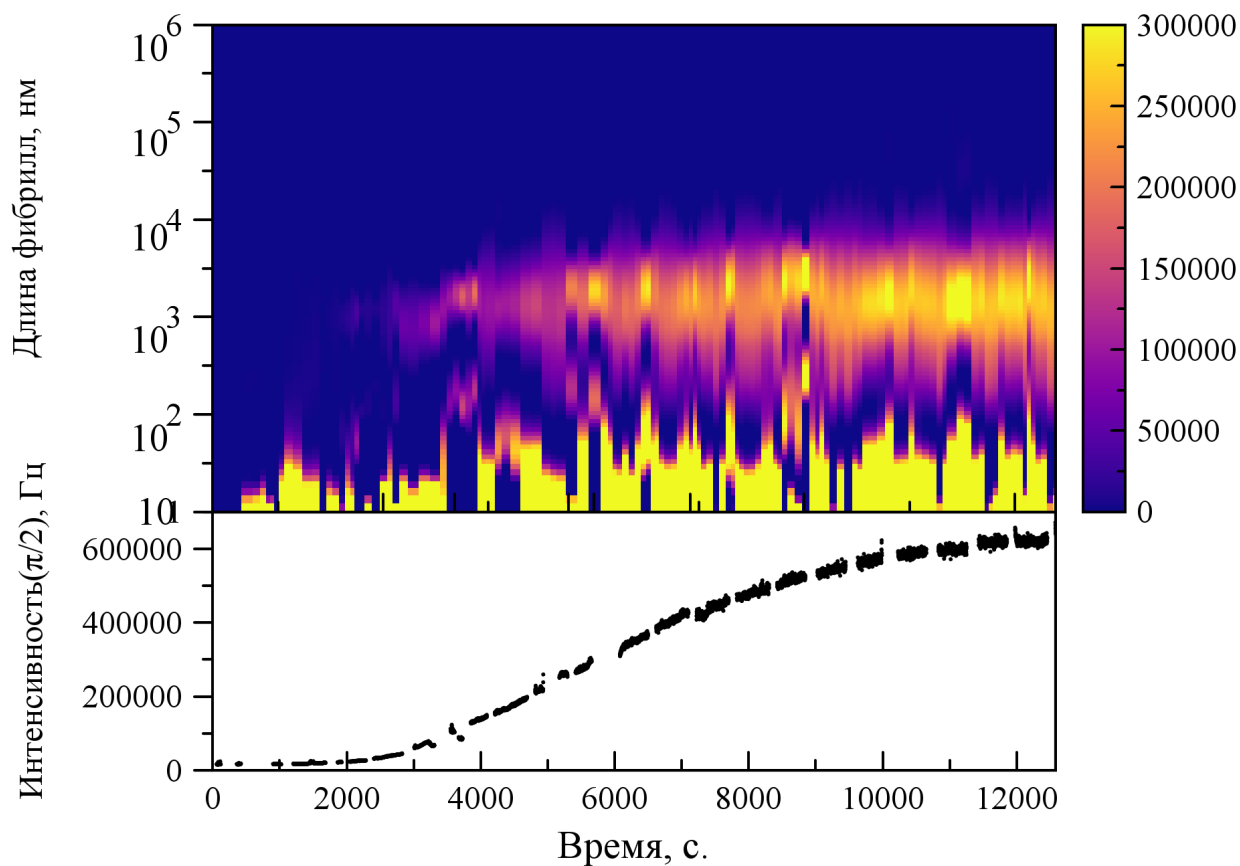


Рис. 19. Сверху - зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-WT от времени агрегации. Снизу - соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

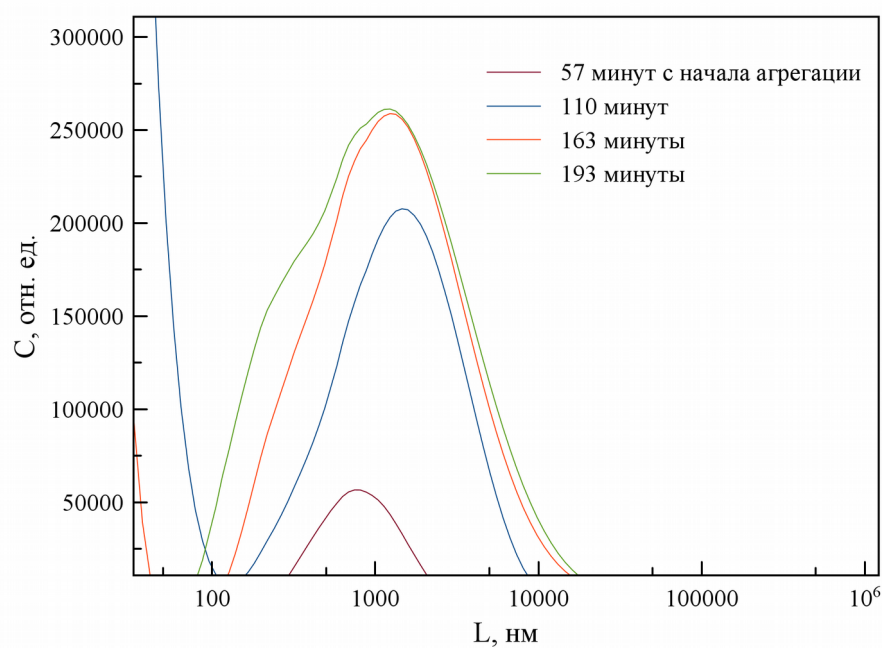


Рис.20. Распределение фибрилл по длинам, взятое для нескольких моментов времени агрегации

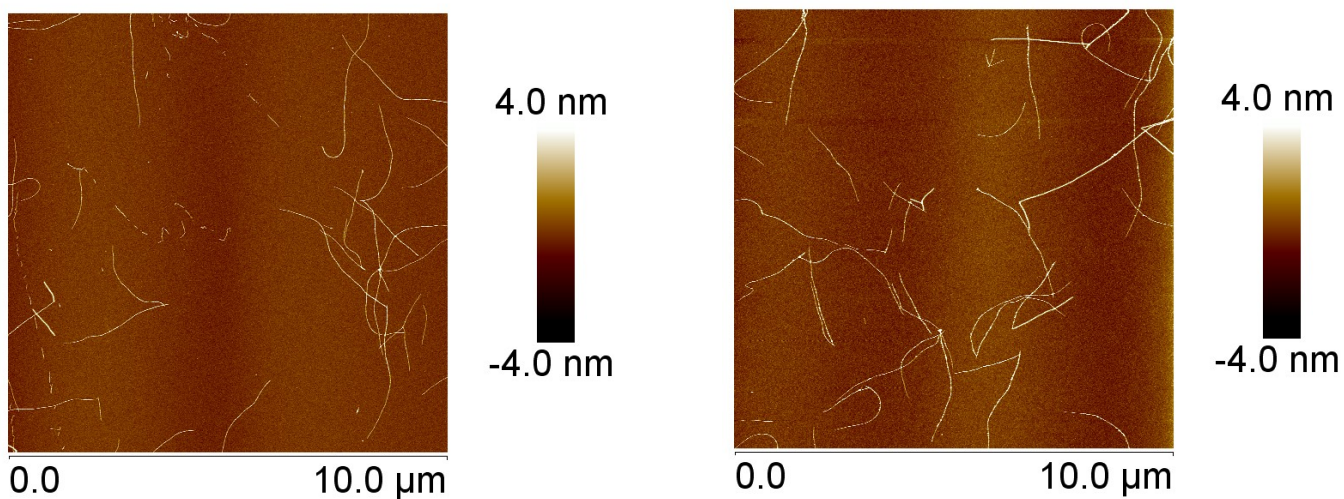


Рис.21. АСМ изображения для белка Sup35-WT, в момент времени 7200 секунд с начала агрегации (область сканирования 10мкм)

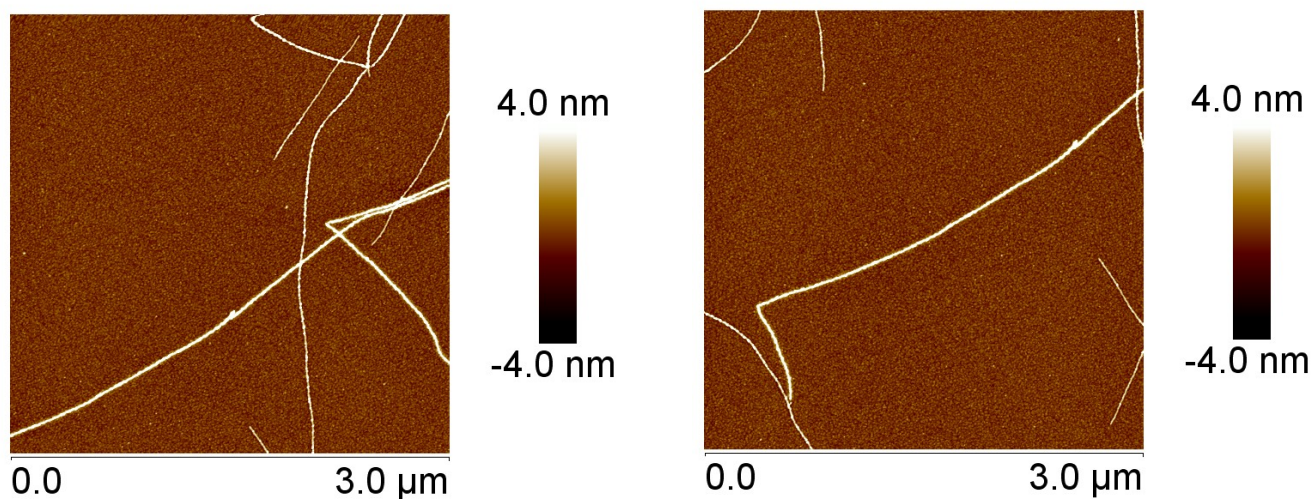


Рис. 22. АСМ изображения для белка Sup35-WT, в момент времени 7200 секунд с начала агрегации (область сканирования 3мкм)

4.3. Изучение агрегации белка Sup35-M5

Агрегация№1.

Агрегация проводилась с перемешиванием, усреднение проводилось по 4 АКФ, пробы на АСМ были взяты в конце агрегации (Рис.24-25)

Можно видеть, что уже через 5000 секунд начинает появляться пик, соответствующий фибриллам длиной 1000 нм, к 10000 секунд он возрастает примерно до 3000-3200 нм, при этом концентрация таких фибрилл сначала возрастает, а потом остается примерно постоянной до конца агрегации. Практически не наблюдается фибрилл, превосходящих 10000 нм. Концентрация небольших фибрилл длиной до 100 нм и мономерного белка остается высокой на протяжении всего времени агрегации.

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

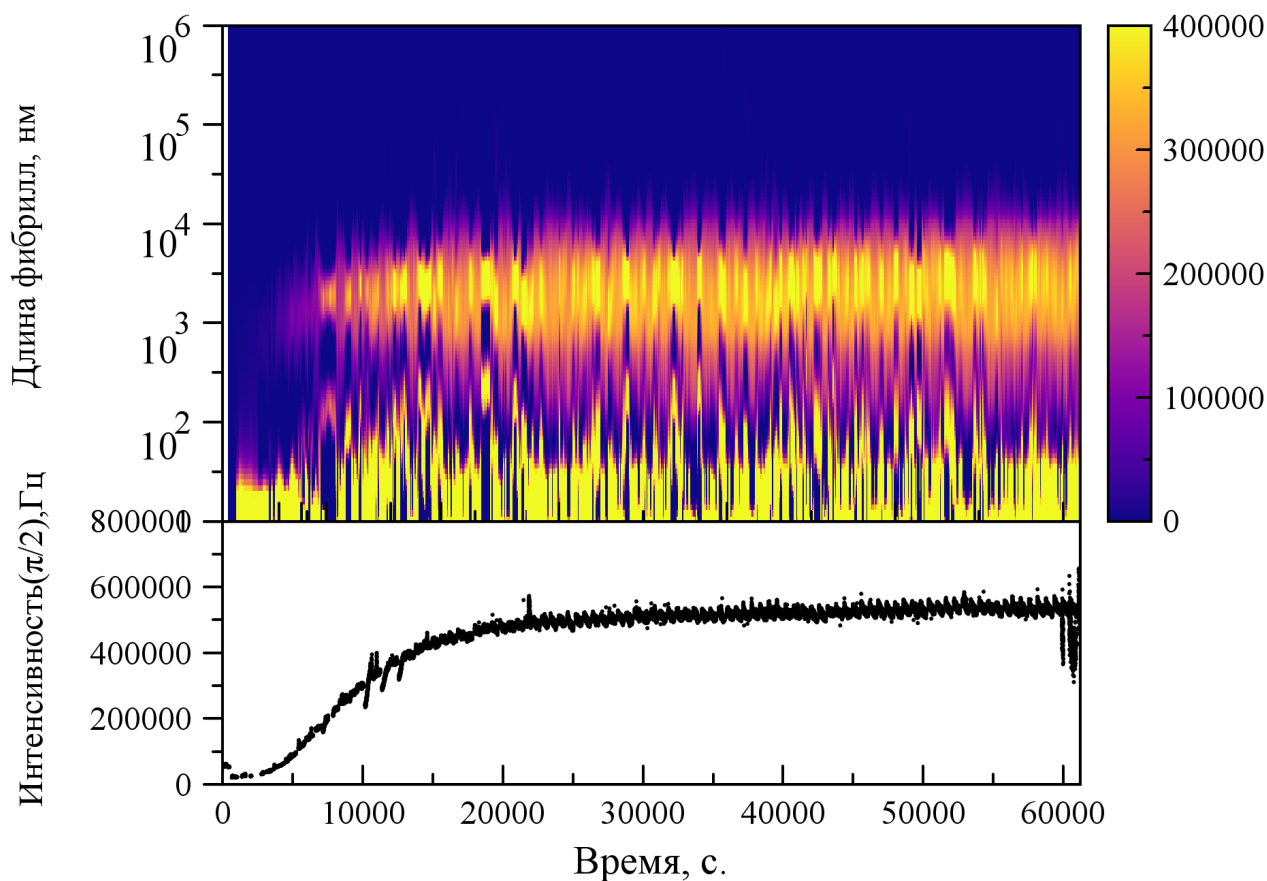


Рис.23. Сверху - зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-M5 от времени агрегации. Снизу - соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

Полученные с помощью АСМ данные качественно показывают наличие в растворах длинных фибрилл, высоты которых составляют от 2 нм до 8 нм. Так как данные были получены в самом конце агрегации, когда преобладают очень длинные запутанные фибриллы, оценить их длины по данным изображениям не представляется возможным.

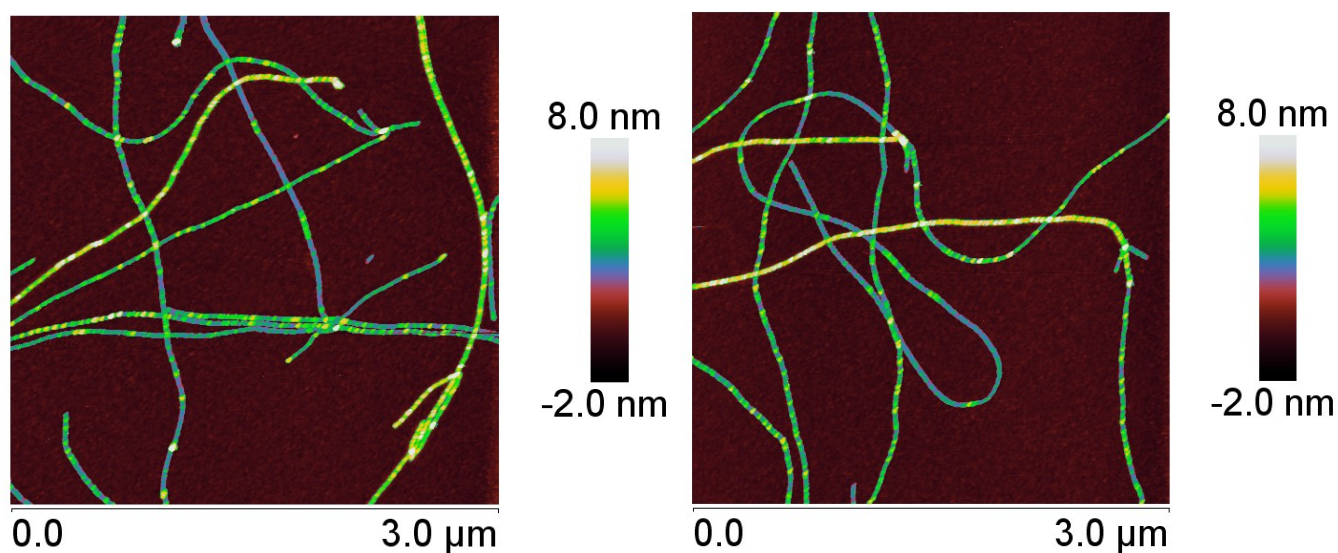


Рис.24. АСМ изображения для белка Sup35-M5, (область сканирования 3 мкм)

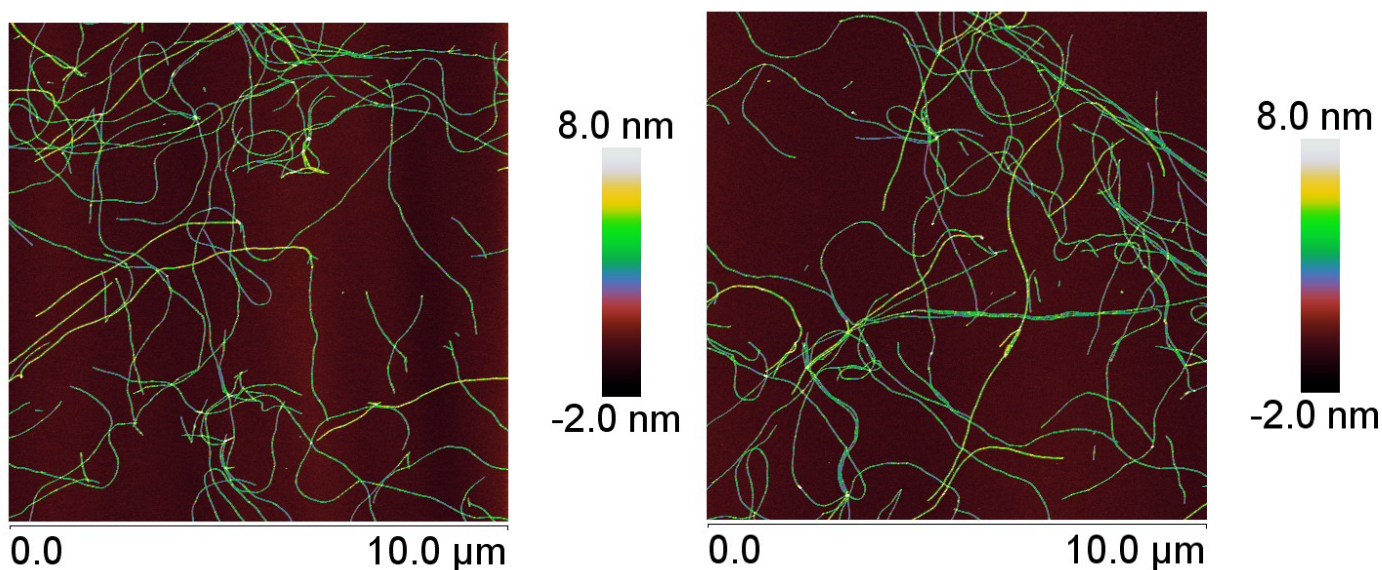


Рис.25. АСМ изображения для белка Sup35-M5, (область сканирования 10 мкм)

Агрегация №2.

Вторая агрегация для Sup35-M5 проводилась без перемешивания магнитной мешалкой, и вид распределения, полученного из ДРС (Рис.26) значительно отличается от распределения, полученного для агрегации с перемешиванием (Рис.23).

В течение первых 10 часов (до 36000 с) наблюдался практически не изменяющийся пик, отвечающий фибриллам длиной до 100 нм с очень высокой концентрацией и более

слабый пик, отвечающий фибриллам с длинами в диапазоне от 350 нм до 10000 нм, концентрация таких фибрилл увеличивалась в течение первых 10 часов. После этого, с 10 до 17 часов происходит резкое возрастание интенсивности. Появляются небольшое количество агрегатов размером до 1000000 нм, также значительно увеличивается концентрация агрегатов размерами 1000-10000 нм и размером до 100-300 нм.

Данные АСМ были сняты в конце агрегации: первоначально были обнаружены очень длинные, слипшиеся в клубки фибриллы (Рис.27), после этого раствор был обработан ультразвуком в течение примерно 5 минут и удалось детектировать короткие фибриллы на подложке (Рис.28).

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

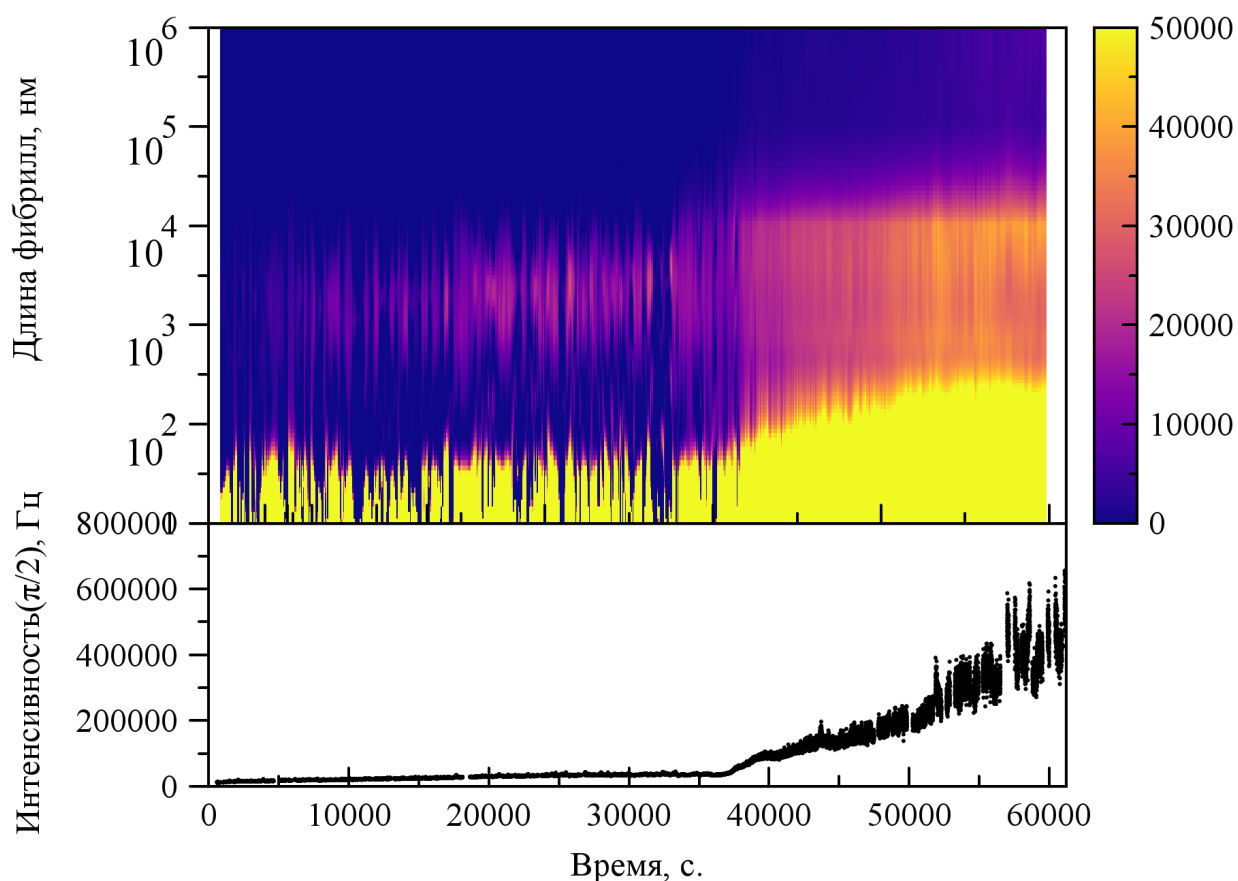


Рис.26. Сверху - зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-M5 от времени агрегации. Снизу - соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

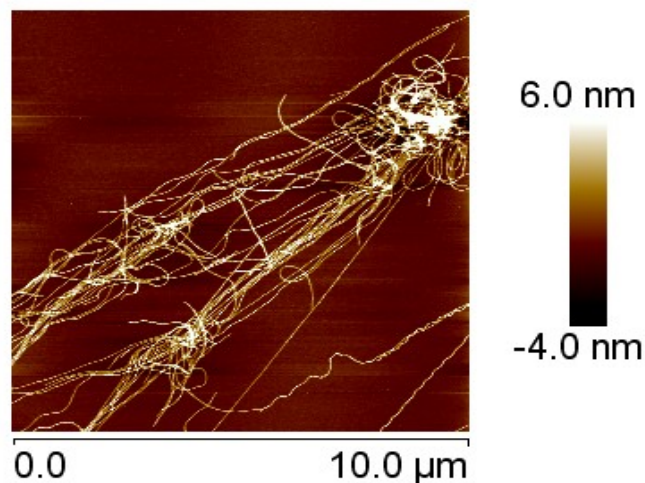


Рис.27. АСМ изображение для белка Sup35-M5, полученное до обработки ультразвуком.

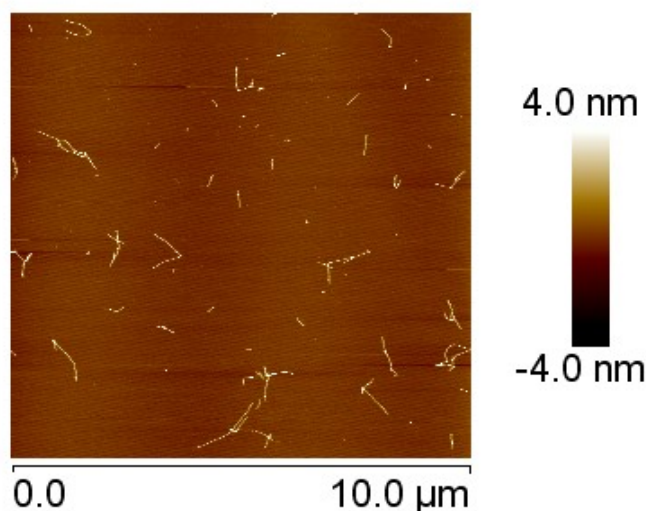


Рис.28. АСМ изображение для белка Sup35-M5, полученное после обработки ультразвуком.

Так как в данной агрегации не проводилось перемешивания, то аномальный вид зависимости распределения может быть связан с эффектами образования агрегатов на стенках кюветы или с тем, что в конце агрегации почти все фибриллы слипаются в большие запутанные клубки, однако остается неясным, почему рост интенсивности происходит так резко.

4.4. Изучение агрегации белка Sup35-74

Агрегация №1.

Агрегация проводилась с перемешиванием, усреднение проводилось по 4 АКФ.

Как и предполагалось исходя из теоретических предпосылок, белок Sup35-74, более короткий участок белка без С-домена, агрегирует гораздо быстрее. На Рисунке

29 уже в самом начале агрегации виден яркий пик, отвечающий длинам порядка 1000 нм, концентрация таких фибрилл при этом очень высока. В течении следующих 10000 секунд происходит смещение пика в область больших длин — порядка 3000 нм, заметны также фибриллы длиной до 10000 нм, также происходит увеличение ширины пика, отвечающее большому разбросу длин. В дальнейшем, после 15000 секунд после начала агрегации, заметно достаточно резкое падение интенсивности пика, по есть снижение концентрации фибрилл. К концу агрегации пик практически полностью пропадает. Падение концентрации фибрилл может быть связано с тем, что быстро агрегирующий белок образует очень крупные агрегаты, которые выпадают в осадок и уже не детектируются в растворе. На пробах АСМ, взятых примерно через 60 минут после начала агрегации заметно только небольшое количество коротких фибрилл (Рис. 30)

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

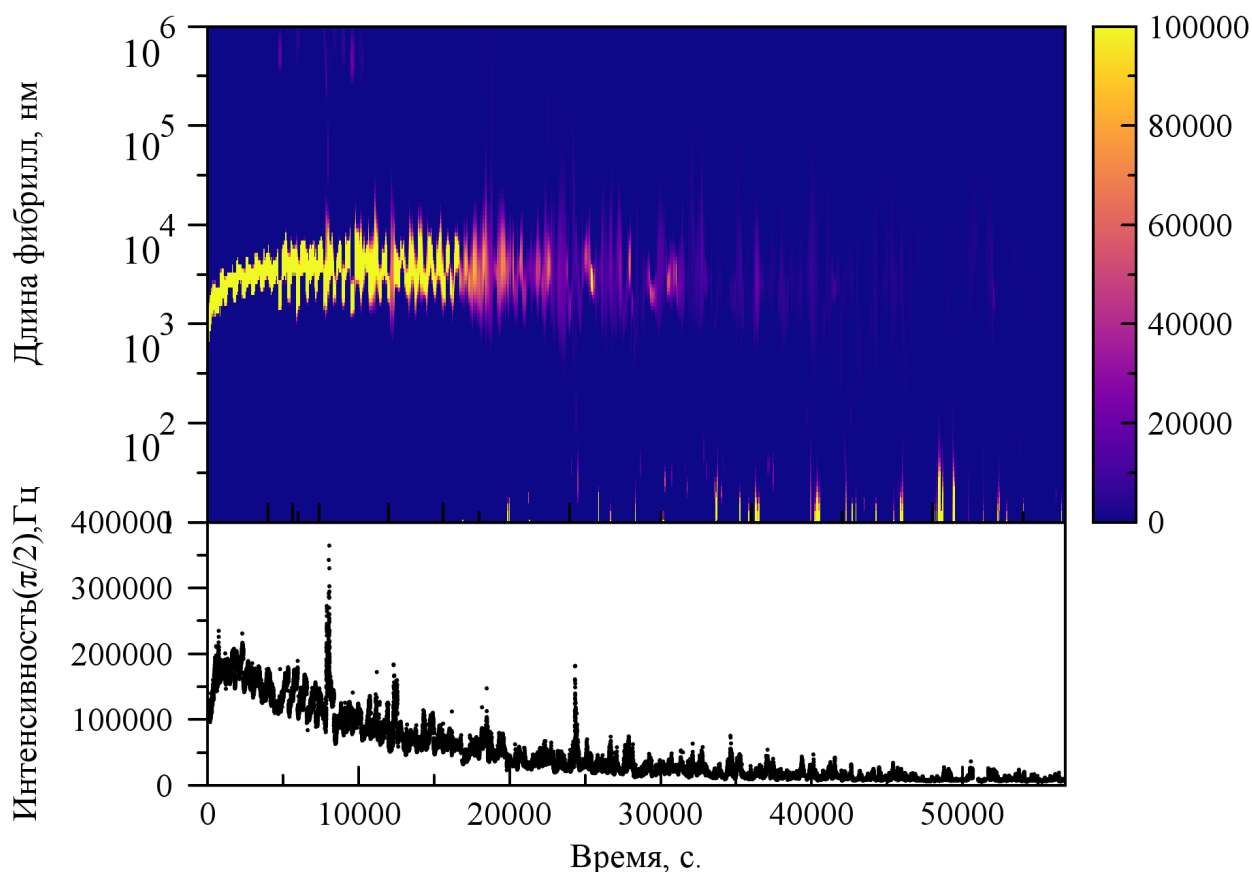


Рис. 29. Сверху - зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-74 от времени агрегации. Снизу - соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

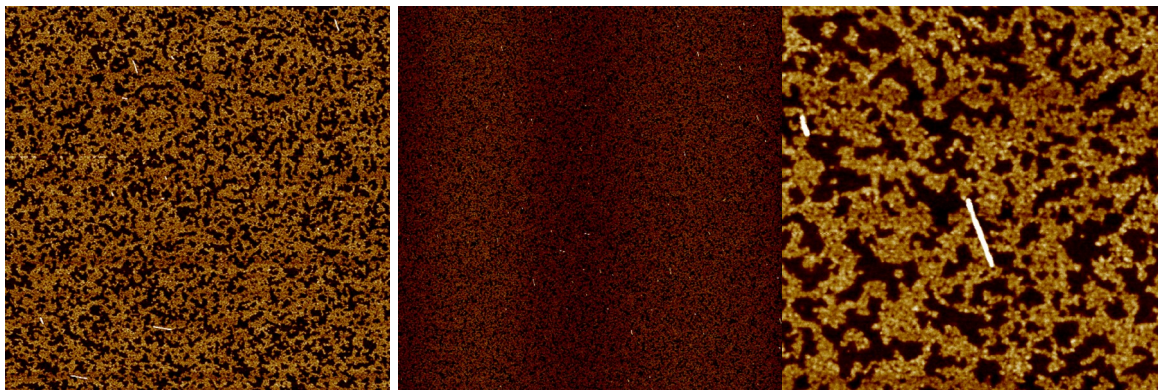


Рис.30. АСМ изображения для белка Sup35-74, полученные через 60 минут после начала агрегации.

Агрегация №2.

Изучалась агрегация белка Sup35-74 с меньшей концентрацией, чем в предыдущей агрегации — 0,0125 мг/мл. Остальные параметры, такие как перемешивание и усреднение по 4 АКФ сохранялись неизменными.

Картина агрегации в целом схожа с предыдущей, заметен резкий пик интенсивности в начале агрегации, соответствующий фибриллам длинами порядка 1000 – 3000 нм, затем падение концентрации фибрилл до почти полного исчезновения. В отличие от предыдущей агрегации, падение концентрации происходит значительно быстрее. Через 10000 секунд после начала агрегации заметно разкое понижение интенсивности пика, в то время как в агрегации №1, подобное падение интенсивности наблюдается примерно через 18000 секунд после начала. Также пик в целом шире, что отвечает большему разбросу длин.

В целом кинетика агрегации белка Sup35-74 на данный момент остается неизвестной, как и структура образующихся агрегатов. Для более подробного изучения механизма агрегации данного белка требуется дальнейший подбор параметров и условий проведения эксперимента, таких как температура, концентрация и другие.

Зависимость распределения фибрилл по длинам от времени агрегации.

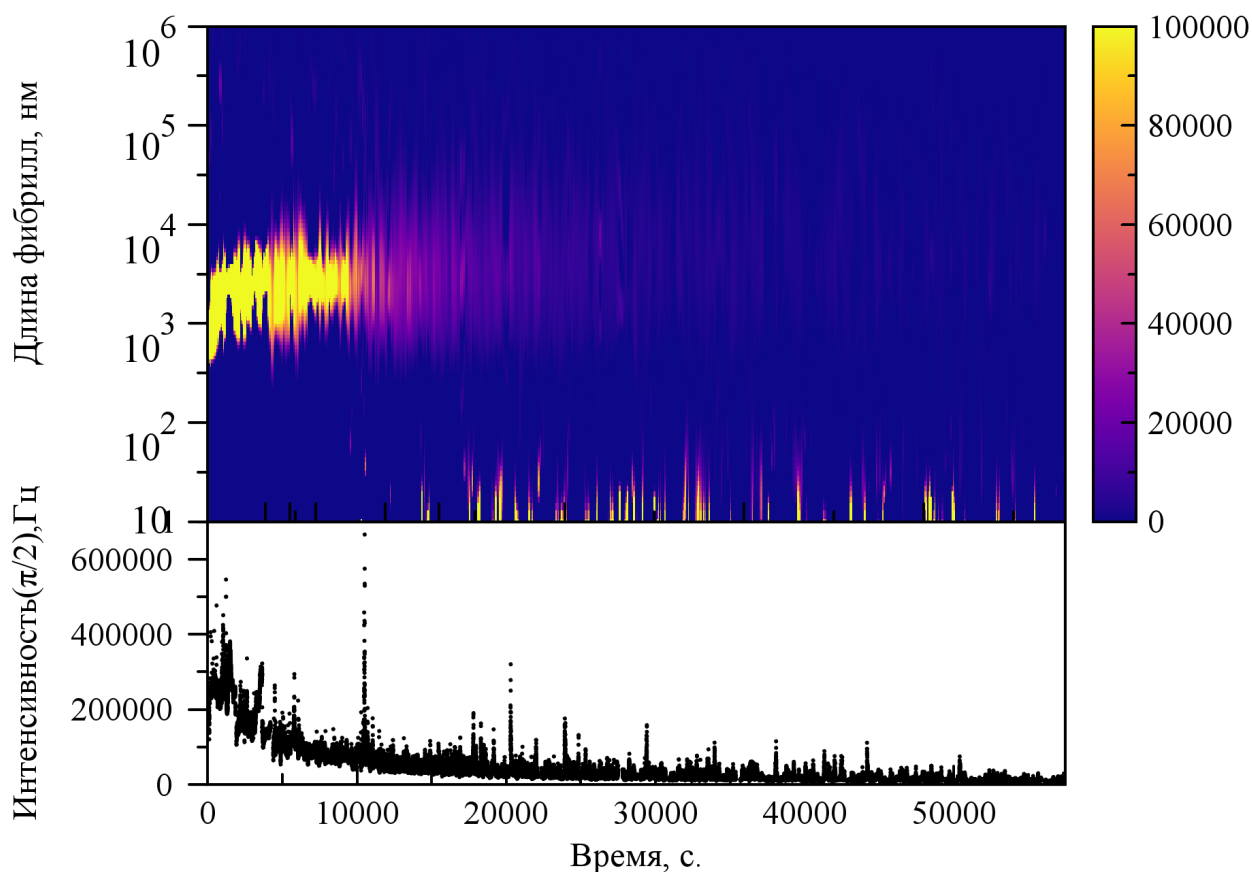


Рис. 31. Сверху - зависимость распределения фибрилл по длинам для Sup35-74 от времени агрегации. Снизу - соответствующая зависимость от времени интенсивности рассеяния под углом 90°

4.5. Сравнение кинетики агрегаций различных образцов.

Самым информативным периодом является начало агрегации, когда еще не успели образоваться крупные агрегаты, затрудняющие анализ. Для сравнения был взят промежуток времени 0-12000 секунд после начала агрегации. Все образцы белка были взяты концентрацией 0,25 мг/мл (кроме Sup35-M0 — его концентрация, возможно, превышает 0,25 мг/мл, так как его исходная концентрация была известна не точно).

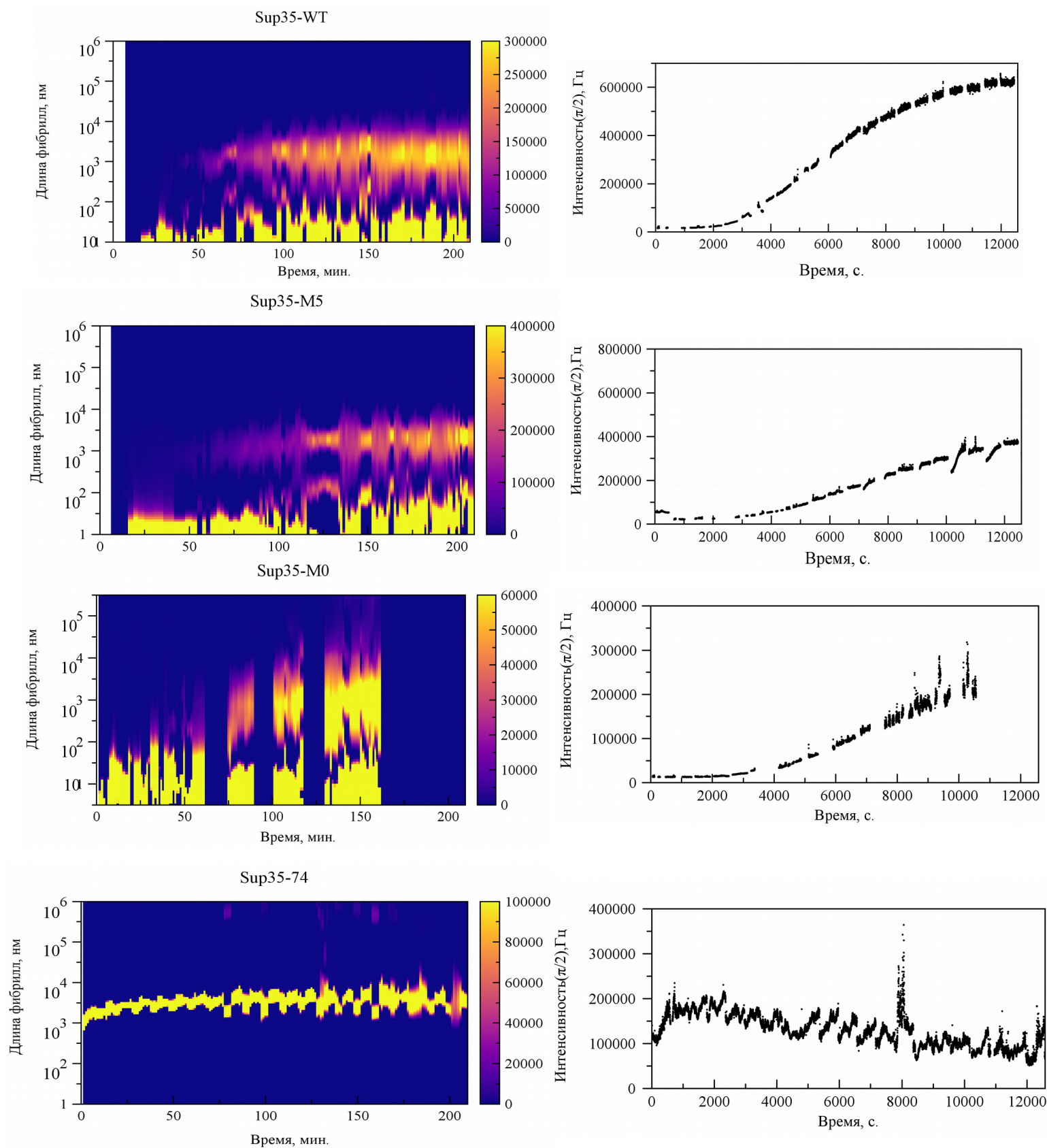


Рис. 32. Сравнение агрегаций для четырех образцов: Sup35-WT, Sup35-M0, Sup35-M5, Sup35-74. В левой колонке представлены распределения фибрилл по длинам от времени, в правой — соответствующие зависимости интенсивности от времени.

Оценка и сравнение некоторых параметров агрегации приведено в таблице 1. На Рисунке 33 и Рисунке 34 представлены распределения фибрилл всех образцов белка по длинам, взятые в моменты времени 50 и 160 минут после начала агрегации.

Таблица 1.

	Sup35-WT	Sup35-M0	Sup35-M5	Sup35-74
Длительность лаг-фазы	2200±100 с	2700±400с	2600±100 с	<1000с
Длительность фазы роста	10000±2000 с	12000±2000 с	18000±2000 с	<1000с
Характерные длины фибрилл	1000-3000 нм	300-3000 нм	1000-3000 нм	3000 нм
Интенсивность к концу агрегации	630 000 ±10000 Гц	220 000 ±50000 Гц	370 000 ±10000 Гц	130 000 ±20000 Гц

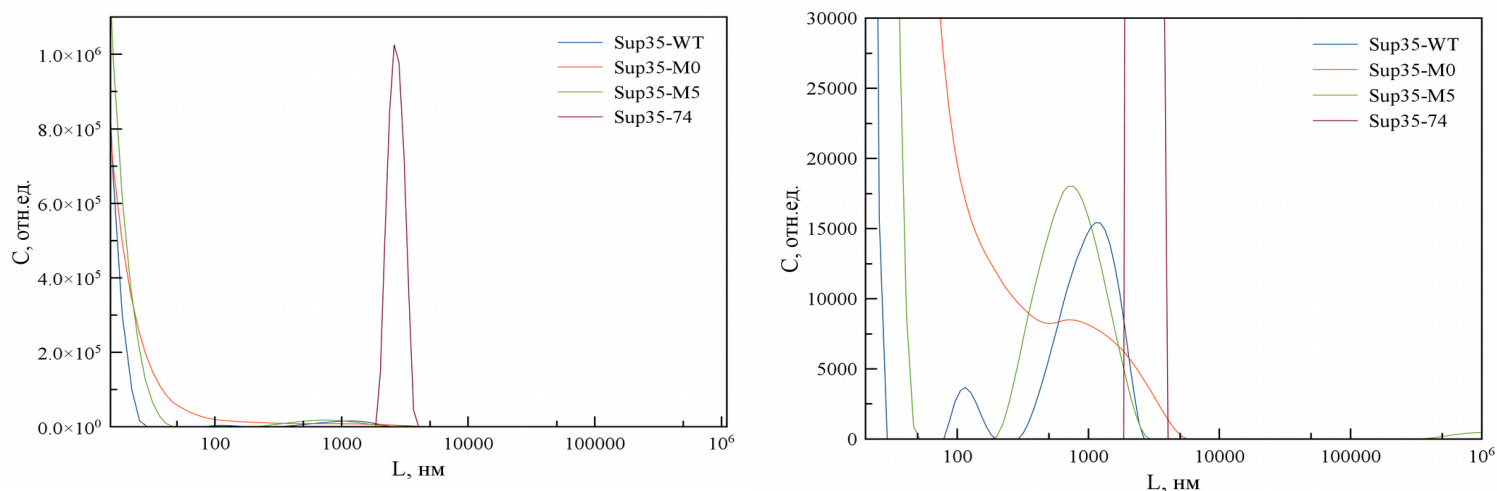


Рис.33. Сравнение высоты и ширины пиков для образцов Sup35-WT, Sup35-M0, Sup35-M5, Sup35-74 для момента времени 50 минут (3000с) после начала агрегации (в разном масштабе)

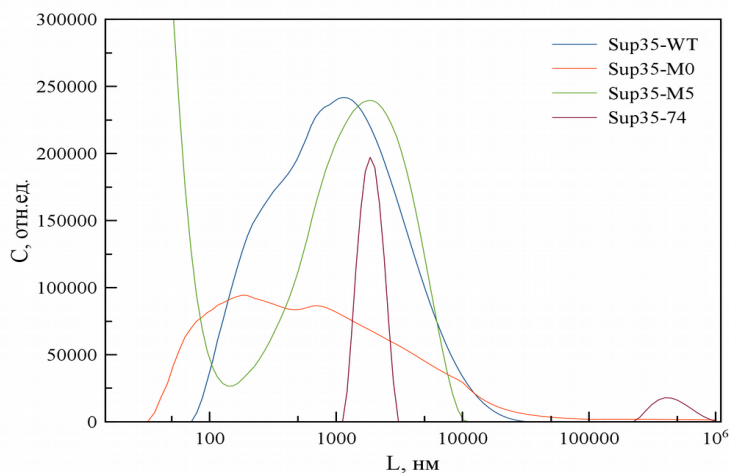


Рис.34. Сравнение высоты и ширины пиков для образцов Sup35-WT, Sup35-M0, Sup35-M5, Sup35-74 для момента времени 160 минут (9600 с) после начала агрегации

Из сравнения видно, что характерные длины фибрилл близки для всех образцов, однако есть существенные различия в разбросе длин. Для Sup35-M0 ширина пика значительно превосходит ширину пика Sup35-WT, в то время как для Sup35-M5 ширина пика напротив меньше, чем для дикого типа. Разброс фибрилл по длинам для Sup35-74 небольшой, пик очень узкий, то есть все фибриллы имеют почти одинаковые длины. Микроскопические исследования Sup35-74 показали наличие незначительного количества фибрилл и большого количества крупных агрегатов, которые могут состоять как из фибрилл, так и из неспецифически агрегированного белка. В связи с этим результаты агрегации этого образца пока невозможно точно трактовать

Длительность лаг-фазы для Sup35-M0 и Sup35-M5 оказалась больше, чем для Sup35-WT, длительность фазы роста для Sup35-M5 тоже больше по сравнению с Sup35-WT. Длительность фазы роста для Sup35-M0 сложно оценить, так как к началу центрифугирования нельзя точно сказать, вышла ли кривая интенсивности на насыщение, однако предположительно она тоже больше, чем для Sup35-WT.

Для Sup35-74 определить длительность лаг-фазы не представляется возможным, она либо очень быстротечная либо в принципе отсутствует. Фаза роста, по всей видимости, сопровождается частичным выпадением образовавшихся агрегатов в осадок, что позволяет лишь сделать вывод о том, что скорость агрегации Sup35-74 существенно превышает скорости агрегации Sup35-M0, Sup35-M5 и Sup35-WT

Влияние мутаций на кинетику агрегации белка:

Как видно из эксперимента, оба мутантных аллеля — M0(QQ33 — KK34) и M5(QQ89-90KK), не привели к потере фактора [PSI], прион оставался активен, агрегация белка происходила во всех случаях. Это позволяет предположить, что обе эти мутации локализуются за пределами фрагмента, необходимого для поддержания приона, что согласуется с полученным ранее результатами для мутации M5.[21]

Для белка Sup35-M5 можно заметить тенденцию к образованию фибрилл, длинами того же порядка, что и фибриллы Sup35-WT, однако с меньшим разбросом.

Из таблицы 1 видно, что интенсивность в конце рассматриваемого промежутка времени для Sup35-M5 ниже, чем для дикого типа, скорость роста фибрилл также ниже. Лаг-фаза для данного образца длится дольше, чем для Sup35-WT, что говорит о том, что затравки образуются дольше. Помимо этого, в сравнении с белком дикого типа, к концу агрегации наблюдается большее количество мономерного белка и мелких образований, что

может означать, что большее количество белка не может образовать фибриллы. В целом, эти параметры говорят о том, что белок Sup35-M5 агрегирует хуже, чем белок Sup35-WT.

Для белка Sup35-M0 отмечаются схожие средние размеры фибрилл, однако гораздо более широкий диапазон длин. Интенсивность в конце промежутка для него также ниже, чем для дикого типа и ниже, чем для Sup35-M5. Скорость роста фибрилл ниже чем для Sup35-WT, однако несколько выше чем для Sup35-M5, длительность лаг-фазы больше, чем для дикого типа и M5. Количество мономерного белка не выше чем для Sup35-WT. Можно заключить, что Sup35-M0 также агрегирует хуже, чем Sup35-WT.

Таким образом, замены, отвечающие мутациям M5 и M0 не приводят к потере приона, однако приводят к некоторому изменению пространственной организации фибрилл белка Sup35NM и, как следствие, затрудняет агрегацию белка и изменяет ее характер.

Для белка Sup35-74, напротив, отмечается гораздо более узкий пик распределения фибрилл, которому при этом соответствует очень большая концентрация. К концу агрегации интенсивность для Sup35-74 ниже, чем для остальных образцов, однако это, вероятно, связано с тем, что к этому времени уже происходит выпадение в осадок. Рост фибрилл происходит очень быстро, длительность лаг-фазы крайне мала. Помимо этого, практически не наблюдается мономерного белка или мелких агрегатов, что может говорить о том, что весь белок агрегирует. Таким образом агрегация Sup35-74 происходит значительно быстрее агрегации Sup35-WT и его мутантных аллелей.

Заключение.

1. Метод динамического рассеяния света позволяет определять зависимость распределения фибрилл прионного белка Sup35NM по длинам от времени его агрегации.
2. Замены M0 (QQ33 — KK34) и M5 (QQ89-90KK) затрудняют агрегацию белка Sup35NM.
3. Отсутствие M-домена в белке Sup35NM упрощает его агрегацию.

Результаты были ранее представлены на VI Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН.

Список использованной литературы.

1. Baxa, U.; Keller, P. W.; Cheng, N.; Wall, J. S.; Steven, A. C. In Sup35p Filaments (the [PSI⁺] Prion), the Globular C-Terminal Domains Are Widely Offset from the Amyloid Fibril Backbone. *Mol. Microbiol.* 2011, 79 (2), 523–532.
2. Бондарев Станислав Александрович. Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI⁺] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Диссертация. 2014
3. Balbirnie, M.; Grothe, R.; Eisenberg, D. S. An Amyloid-Forming Peptide from the Yeast Prion Sup35 Reveals a Dehydrated Beta-Sheet Structure for Amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, 98 (5), 2375–2380.
4. Shewmaker, F.; Wickner, R. B. B.; Tycko, R. Amyloid of the Prion Domain of Sup35p Has an in-Register Parallel Beta-Sheet Structure. *PNAS* 2006, 103 (52), 4000–4007.
5. Liebman, S. W.; Chernoff, Y. O. Prions in Yeast. *Genetics* 2012, 191 (4), 1041–1072.
6. Bondarev, S. A.; Zhouravleva, G. A.; Belousov, M. V.; Kajava, A. V. Structure-Based View on [PSI⁺] Prion Properties. *Prion* 2015, 9 (190), 199.
7. Wickner, R. B.; Edskes, H. K.; Bateman, D. A.; Kelly, A. C.; Gorkovskiy, A.; Dayani, Y.; Zhou, A. Amyloids and Yeast Prion Biology.
8. Kishimoto, A.; Hasegawa, K.; Suzuki, H.; Taguchi, H.; Namba, K.; Yoshida, M. β -Helix Is a Likely Core Structure of Yeast Prion Sup35 Amyloid Fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 315 (3), 739–745.
9. Chen, B.; Thurber, K. R.; Shewmaker, F.; Wickner, R. B.; Tycko, R. Measurement of Amyloid Fibril Mass-per-Length by Tilted-Beam Transmission Electron Microscopy. *PNAS* 2009, 106 (34), 14339–14344.
10. Kinoshita, M., Lin, Y., Nakatsuji, M., Inui, T., Lee, Y.-H. Kinetics and polymorphs of yeast prion Sup35NM amyloidogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017, 102, 1241-1249
11. Streets AM, Sourigues Y, Kopito RR, Melki R, Quake SR (2013) Simultaneous Measurement of Amyloid Fibril Formation by Dynamic Light Scattering and Fluorescence Reveals Complex Aggregation Kinetics. *PLoS ONE* 8(1): e54541.
12. A. Gladytz, E. Lugovoy, A. Charvat, T. Häupl, K. R. Siefermann, B. Abel. Intermediates caught in the act: tracing insulin amyloid fibril formation in time by combined optical spectroscopy, light scattering, mass spectrometry and microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 918
13. Kim, J.R., Muresan, A., Lee, K.Y.C., Murphy, R.M.. Urea modulation of β -amyloid fibril growth: Experimental studies and kinetic models. *Protein Science*. 2004. 13(11), 2888-2898

14. В. Л. Миронов. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений. Российская академия наук, Институт физики микроструктур.г. Нижний Новгород, 2004 г. - 110 с.
15. Введение в физику поверхности. Оура К., Лифшиц В.Г., Саранин А.А., Зотов А.В., Катаяма М..М.: Наука, 2006. — 490 с.
16. Bruce J. Berne, Robert Pecora. Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics.
17. Сказка В.С. Динамическое рассеяние света и тепловое движение макромолекул в растворах. Успехи Химии. 1984. Т. 52.
18. Provencher, S.W., 1982. Contin: a General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral Equations. Comput. Phys. Commun. 27, 229–242
19. Waterman, P.C., 1965. Matrix formulation of electromagnetic scattering. Proc. IEEE 53, 805–812. doi:10.1109/PROC.1965.4058
20. Mishchenko, M.I., Travis, L.D., Mackowski, D.W., 1996. T-matrix computations of light scattering by nonspherical particles: A review. J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf. 55, 535–575.
21. Bondarev, S. a., Shchepachev, V. V., Kajava, A. V., Zhouravleva, G. a., 2013. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion [PSI⁺] stability and propagation. J. Biol. Ch
22. Zhao, H., Brown, P.H., Schuck, P., 2011. On the distribution of protein refractive index increments. Biophys. J. 100, 2309–17.